Regulation der Aktivität von Phosphoglucose-isomerase und Phosphoglucomutase während der Morphogenese kernhaltiger und kernloser Acetabularien

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Gerd Ernst Grieninger

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0079

Regulation der Aktivität von Phosphoglucose-isomerase und Phosphoglucomutase während der Morphogenese kernhaltiger und kernloser Acetabularien

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Gerd Ernst Grieninger

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 1970

Dekan: Professor Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter: Dozent Dr. K. Zetsche
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Bünning

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1	Kultur der Pflanzen	4
2.2	Herstellung geeigneten Pflanzenmaterials	4
2.3	Gewinnung der Enzymrohextrakte (Standardbedingungen)	4
2.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten (Standardbedingungen)	5
2.5	Proteinbestimmung	7
2.6	Versuchswerte	7
2.7	Chemikalien mit Abkürzungen	7
2.8	Weitere Abkürzungen	8
3.	ERGEBNISSE	9
3.1	Charakterisierung der Phosphoglucose-isomerase	9
3.2	Charakterisierung der Phosphoglucomutase	19
3.3	Verhalten der PGI- und PGM-Aktivität im Verlauf der Morphogenese kernhaltiger und kernloser Pflanzen	26
3.4	Unterschiedliche Synthese der Enzyme in den verschiedenen Zellregionen	39
4.	DISKUSSION	47
5.	ZUSAMMENFASSUNG	53
6.	LITERATURVERZEICHNIS	54

1. EINLEITUNG

Bei der einzelligen und einkernigen Grünalge Acetabularia mediterranea wächst aus der Zygote ein schlauchförmiger Stiel, der an seiner Spitze eine Anzahl vergänglicher Wirtel bildet. Am basalen Ende entsteht ein Rhizoid, das den Kern beherbergt. Das Längenwachstum wird mit der Bildung eines schirmförmigen Gametangienständers - kurz Hut genannt - beendet. Sobald der Hut eine maximale Größe erreicht hat, teilt sich der große Primärkern; die Sekundärkerne werden durch Plasmaströmung in den Hut transportiert. Dort findet dann die Cystenbildung statt.

Diese Morphogenese, charakterisiert durch die zeitlich und räumlich koordinierte Abfolge spezifischer Differenzierungsprozesse,wird durch bestimmte Stoffe (sog. "morphogenetische Substanzen" nach HÄMMERLING, 1963) gesteuert, die aus dem Kern in das Cytoplasma austreten; es handelt sich hierbei um recht stabile m-RNA (BRACHET et al., 1964; BRACHET, 1965; ZETSCHE, 1964, 1965, 1966 a, b). Der Nachweis, daß die Steuerung des zeitlichen Ablaufs der Formbildung (Stiel-, Wirtel- und Hutbildung) im Cytoplasma und nicht durch differentielle Genaktivierung erfolgt, konnte mit kernlosen Pflanzen erbracht werden, die noch zu beträchtlichen synthetischen wie auch morphogenetischen Leistungen befähigt sind (ZETSCHE, 1966 c; HÄMMERLING und ZETSCHE, 1966).

In neuester Zeit konnte gezeigt werden, daß auch die Synthese von Enzymen, die mit der Stiel- und Hutbildung in engem Zusammenhang stehen, auf cytoplasmatischer Ebene geregelt wird. Als Ausgangspunkt dieser Untersuchungen diente der Nachweis, daß die Stiel- und Hutregion bei Acetabularia mediterranea eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung aufweist.

Die Polysaccharide des Stieles und Hutes enthalten hauptsächlich Mannose und nur geringe Mengen Glucose und Galactose. Im Hut ist der Glucose- und Galactose-Gehalt

jedoch beträchtlich größer; Rhamnose und geringe Mengen Xylose werden nur in dieser Region gefunden. Im Gegensatz dazu enthalten die Polysaccharide der Cysten hauptsächlich Glucose, neben Mannose und im Vergleich zum Hut etwas größere Mengen Xylose. Zellen, deren Kern vor der Hutbildung entfernt wurde, weisen diese Unterschiede in der Zusammensetzung der Stiel- und Hutpolysaccharide auch auf (ZETSCHE, 1967; ZETSCHE et al., 1970; ANDERS und ZETSCHE, 1969).

Die Regulationsprozesse, die diese unterschiedliche Zusammensetzung bewirken, laufen demnach auch in kernlosen Zellen ab. Wahrscheinlich ist die enzymatische Grundlage dieser Unterschiede bzw. die sie bewirkenden Regulationsprozesse beim Syntheseweg zu den Nucleotidzuckern zu suchen, die Vorstufen für die Synthese komplexer Kohlenhydrate - wie Mannane, Glucane, Galactane - sind (Abb. 1; GINSBURG, 1964; HASSID, 1967; NORTHCOTE, 1969). ZETSCHE konnte mehrere an diesem Weg beteiligte Enzyme bei Acetabularia mediterranea nachweisen (1966 e). Zwei Enzyme, die für die Synthese von UDPG und UDPGal aus F-6-P benötigt werden, wurden bisher genauer untersucht: die UDPG-Pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.9) und die UDPG-4-Epimerase (E.C.5.1.3.2). Es konnte gezeigt werden, daß ihre Synthese während der Morphogenese im Cytoplasma reguliert wird (ZETSCHE, 1966 d, 1968 a).

Weitere Untersuchungen sollten nun klären, ob sämtliche Enzyme des Glucose-Galactose-Syntheseweges in Zusammenhang mit der Hutbildung im Cytoplasma gleichartig reguliert werden.

Abb. 1:

Biosyntheseweg der Nucleotidzucker
Abkürzungen s. 2.7. Weitere Abkürzungen:

M-1-P: Mannose-1-phosphat
GDP-M: Guanosin-diphosphat-mannose
ADP-G: Adenosin-diphosphat-glucose
UDP-Gal: Uridin-diphosphat-galactose
UDP-Rham: Uridin-diphosphat-rhamnose
UDP-Xyl: Uridin-diphosphat-xylose

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kultur der Pflanzen

Verwendet wurden verschiedene Nachzuchten von Acetabularia mediterranea aus dem hiesigen Institut. Sie wurden nach der üblichen Kulturmethode (HÄMMERLING, 1963) in Erdschreiberlösung bei 2 500 Lux im 12:12 h Licht-Dunkelwechsel herangezogen. In manchen Fällen wurde aber Glycerophosphat anstelle von Na_2HPO_4 als Phosphatquelle verwendet. Es zeigen sich hinsichtlich des Verhaltens der Enzymaktivitäten keine Unterschiede.

2.2 Herstellung geeigneten Pflanzenmaterials

Kernhaltige Stielhinterstücke - meist 15 mm lang - wurden durch Amputation der vorderen Stielteile hergestellt.
Kernlose Pflanzen wurden durch Abschneiden des kernhaltigen Rhizoids gewonnen.
Vorderstücke, Mittelstücke und Hinterstücke ohne Rhizoid wurden durch Zerlegen der Zellen in möglichst gleich große Teilstücke erhalten.
Die Zellteile waren nach der Operation 12 h diffusem Licht, danach 24 h den normalen Kulturbedingungen ausgesetzt, bevor sie für die Versuche verwendet wurden.

2.3 Gewinnung der Enzymrohextrakte (Standardbedingungen)

Die Pflanzen wurden vor ihrer Verwendung kurz in bidest. Wasser gewaschen und mit Filtrierpapier abgetupft, dann in einem für das zu prüfende Enzym geeigneten Homogenisationsmedium mit einem Glashomogenisator (Typ Potter Elvehjem) aufgeschlossen. Dem Homogenisat wurde Triton-x-100 zugesetzt und zur Entfernung der Zellwand- und Chloroplastentrümmer 2 min mit 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt als Enzymlösung benutzt. Die Herstellung der Enzymrohextrakte erfolgte kurz vor der Bestimmung der Enzymaktivitäten bei maximal 4°C.

Zusammensetzung der einzelnen Homogenisationsmedien (Endkonzentrationen, Gesamtvolumen 3 ml):

2.31 Für die Phosphoglucose-isomerase

Tris pH 7,5 45 mM
EDTA (mit NaOH neutr.) 5 mM;

Triton-x-100 1 %.

2.32 Für die Phosphogluco-mutase

TRAP pH 7,6 50 mM
EDTA (mit NaOH neutr.) 5 mM
$MgSO_4$ 8 mM;

Triton-x-100 2 %.

2.33 Für die UDPG-Pyrophosphorylase (ZETSCHE, 1968 a)

Tris pH 7,5 33 mM
Cystein (mit NaOH neutr.) 5,7 mM
$MgCl_2$ 5 mM;

Triton-x-100 1 %.

2.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten (Standardbedingungen)

Die Enzymaktivitäten wurden nach der Methode des zusammengesetzten optischen Tests bestimmt (BÜCHER et al., 1964). Die Geschwindigkeit der $NADP^+$-Reduktion wurde mit dem Bausch & Lomb-Spektralphotometer 600E bei 340 m/u gemessen und mit dem Sargent-Recorder SR registriert bzw. bei 366 m/u mit dem Eppendorf-Photometer 1101M mit Küvettenwechselautomat gemessen und mit dem Kompensationsschreiber 4412 über eine Transformationsstufe 1853 registriert. Die Messung der Enzymreaktion erfolgte bei 30°C; die konstante Temperatur wurde durch einen temperierten Küvettenhalter gewährleistet, der mit einem zirkulierenden Wasserbad (Colora-Ultra-Thermostat, Colora-Tauchkühler) verbunden war. Die Enzymlösung wies eine sehr geringe NADPH-Oxydase-aktivität auf; im Reaktionsmedium befand sich daher - wie unten angegeben - 0,013 mM NADPH. Da beide Küvetten- Ver-

gleichsküvette und Meßküvette - bis auf das Substrat das gleiche Reaktionsmedium enthielten, wurde, wenn wir mit dem Zweistrahlgerät arbeiteten, auf diese Weise die Rückoxidation von NADPH automatisch kompensiert.

Für die einzelnen Enzyme wurden folgende Reaktionsmedien verwendet (Endkonzentrationen, Gesamtvolumen 3 ml):

2.41 Phosphoglucose-isomerase

Tris pH 8,1	45 mM
F-6-P	1,3 mM
NADP	0,53 mM
NADPH	0,013 mM
G-6-PDH	0,85 U

Gesamt-pH 7,9. Start der Reaktion mit 0,2 ml Enzymlösung.

2.42 Phosphoglucomutase

Imidazol-Puffer pH 7,8	40 mM
G-1-P	0,79 mM
G-1,6-diP	0,067 mM
$NADP^+$	0,53 mM
NADPH	0,013 mM
G-6-PDH	2,3 U

Gesamt-pH 7,7. Start der Reaktion mit 0,2 ml Enzymlösung. Die Mg^{2+}-Konzentration - durch die 0,2 ml Enzymlösung eingebracht - beträgt im Reaktionsmedium 0,53 mM.

2.43 UDPG-Pyrophosphorylase (ZETSCHE, 1968 a)

Tris pH 7,5	33 mM
Cystein (mit NaOH neutr.)	1,43 mM
$MgCl_2$	5 mM
UDPG	0,71 mM
$NADP^+$	0,29 mM
NADPH	0,013 mM
G-1,6-diP	0,0014 mM
PGM	2 U
G-6-PDH	5,8 U
Na-pyrophosphat	1 mM

Enzymlösung wird 0,2 ml zugegeben. Start der Reaktion durch Zugabe von Na-pyrophosphat.

Die Enzymaktivitäten sind als milli-units (m/uMole Substrat/min) pro Pflanze bzw. bei Angabe der spezifischen Aktivität als mU pro /ug Protein-N angegeben.

2.5 Proteinbestimmung

2.51 Der nicht in Trichloressigsäure lösliche Stickstoff wurde mit der Micro- K j e l d a h l -Methode bestimmt. Die Proteinwerte sind als /ug Protein-Stickstoff pro Zelle angegeben. Aus dem Stickstoffgehalt der Proteine (ca. 16 %) kann durch Einsetzen eines Faktors von 6,25 näherungsweise der Proteingehalt bestimmt werden.

2.52 Die löslichen Proteine wurden etwas modifiziert nach LOWRY (1951) bestimmt.

2.6 Versuchswerte

Jeder angegebene Wert ist in der Regel der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal mit verschiedenen Nachzuchten wiederholt. Bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten bestanden die Proben aus 10 (PGM, UDPG-Pyr) bzw. 15 (PGI) Pflanzen, bei den Proteinbestimmungen aus 10 bis 20 Pflanzen. Es sei besonders darauf hingewiesen, daß deshalb die Kurvenpunkte Mittelwerte von 30 bis 60 Pflanzen darstellen.

Die angegebenen Fehlerabweichungen repräsentieren die Standardabweichung des arithmetischen Mittels.

Mittelwerte wurden mit dem t-Test auf die Signifikanz von Unterschieden geprüft.

2.7 Chemikalien mit Abkürzungen

F-6-P: Fructose-6-phosphat
6-PG: 6-Phosphogluconat
G-1-P: Glucose-1-phosphat

G-1,6-diP: Glucose-1,6-diphosphat
M-6-P: Mannose-6-phosphat
$NADP^+$: Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH: reduziertes NADP
UDPG: Uridin-diphosphat-glucose
PGI: Phosphoglucose-isomerase
PGM: Phosphoglucomutase
TRAP: Triäthanolamin-Puffer
Tris: Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Puffer

wurden von Boehringer, Mannheim bezogen.

Von Serva, Heidelberg stammten:

Cystein
Imidazol
EDTA: Äthylendiamintetra-acetat
Triton-x-100
Actinomycin D
Puromycin

und folgende GOOD-Puffer (GOOD et al., 1966):

Bicine: N,N'-Bis-(2-hydroxyäthyl)-glycin
HEPES: N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
MOPS: N-Morphino-3-propan-sulfonsäure
TAPS: N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-3-aminopropan-sulfonsäure
TES: Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-amino-äthansulfonsäure
Tricine: N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin.

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt bezogen.
Die wässrigen Lösungen wurden mit aqua bidest. angesetzt.

2.8 Weitere Abkürzungen

K_m: MICHAELIS-Konstante
K_p: veränderte K_m bei Anwesenheit eines Inhibitors
K_i: Inhibitor-Konstante
[I]: Inhibitorkonzentration

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Phosphoglucose-isomerase (D-Glucose-6-phosphat ketol-isomerase E.C.5.3.1.9)

3.11 Allgemeines

Das Enzym konnte - nach der Entdeckung durch LOHMANN (1933), einer partiellen Reinigung durch SLEIN (1955) - von NOLTMANN und BRUNS (1959) rein dargestellt, charakterisiert und von KLOTZSCH und BERGMEYER (1960) kristallisiert werden. Die Aktivitätsbestimmung der PGI erfolgte in dem von SLEIN (1950, 1955) ursprünglich für die PMI angegebenen zusammengesetzten optischen Test, wobei das in der Indikatorreaktion gebildete NADPH die Meßgröße darstellt. Eine Störung der Kinetik der PGI-Reaktion durch PMI kann ausgeschlossen werden, da wir in den unter 2.31 beschriebenen Bedingungen keine PMI-Aktivität fanden.

F-6-P-Präparate enthalten im allgemeinen Beimengungen von G-6-P; bei unseren Experimenten haben wir zwei verschiedene Präparate mit 1,2 bzw. 2,3 % G-6-P verwendet. Die Meßreaktion wurde mit Enzymlösung gestartet, nachdem zuvor das G-6-P über die Indikatorreaktion eliminiert wurde.

Im Proportionalitätsbereich des Tests weist die PGI-Reaktion (Zeit-Umsatz-Kurve) über mindestens 10 min eine lineare Kinetik auf, später macht sich eine zunehmende leichte Reaktionshemmung bemerkbar, die wahrscheinlich auf einer Hemmung des Enzyms durch das in der Indikatorreaktion gebildete 6-PG beruht (s.u.).

3.12 Optimalisieren von Homogenisations- und Reaktionsmedium

Als Ausgang für unsere Untersuchungen diente das von ZETSCHE (1966 e) verwendete Homogenisations- und Reaktionsmedium.
Das Enzym sollte unter optimalen Bedingungen homogenisiert (geeigneter Puffer, pH, gewisse Ionen und andere

Zusätze) und getestet werden (Puffer, pH, Substratsättigung, Überschuß an Indikatorsystem).

3.121 Verschiedene Puffersysteme wurden getestet: TRAP, Tris, verschiedene GOOD-Puffer (s. 2.7). Tris pH 7,5 45 mM im Homogenisationsmedium und pH 8,1 45 mM im Reaktionsmedium (Abb. 2) waren am günstigsten. Kriterien waren neben der Enzymaktivität für das Homogenisationsmedium die Stabilität des Enzyms im Rohextrakt (Abb. 3) und für das Reaktionsmedium eine lineare Kinetik der PGI-Reaktion. TRAP fiel gegenüber Tris merklich ab, während die GOOD-Puffer beim gleichen pH und gleicher Molarität fast identische Werte lieferten.

3.122 Reduzierende Agenzien wie Mercaptoäthanol und Cystein zeigten in beiden Medien keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. EDTA wurde im Homogenisationsmedium benötigt (5 mM, das entspricht bei 0,2 ml Enzymlösung 0,33 mM EDTA im Reaktionsmedium).

3.123 Bei Zugabe von Triton-x-100 zum Homogenisat wurde die PGI-Aktivität fast auf das Doppelte erhöht:

% Triton (v/v)	PGI-Aktivität (mµMole F-6-P/min/Pfl.)
0	26
0,5	46
1	45
2	47
5	46

Die PGI ist also - wenigstens zum Teil - an Membranen gebunden. Es sei hier an ähnliche Aktivitätserhöhungen durch Triton-x-100 bei Phosphatasen (TRIPLETT et al., 1965) und der UDPG-Pyrophosphorylase erinnert (ZETSCHE, 1968 a).

3.124 $NADP^+$-Konzentration: Das Coenzym der Indikatorreaktion war mit 0,53 mM im Überschuß vorhanden.

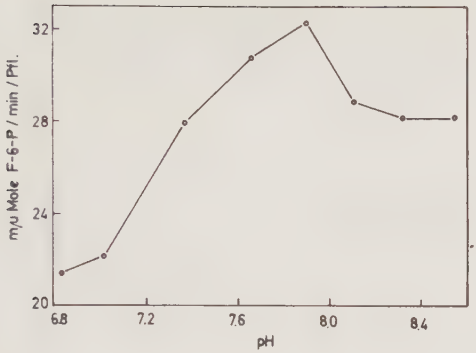

Abb. 2:

Abhängigkeit der PGI-Aktivität vom Gesamt-pH im Reaktionsmedium. Das pH-Optimum von 7,9 wird durch Eingabe von Tris pH 8,1 gewährleistet.

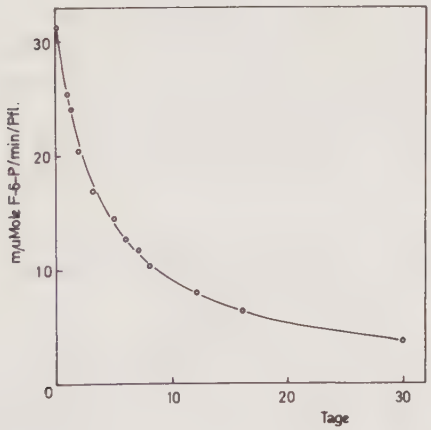

Abb. 3:

PGI-Stabilität im Rohextrakt. Der Rohextrakt wurde während der Versuchsdauer bei maximal 4°C gelagert. Homogenisations- und Reaktionsmedium nach ZETSCHE (1966 e); mit unserem Standard-Reaktionsmedium finden wir analoge Verhältnisse.

3.125 Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Substratsättigungskurve, s. Abb. 4) zeigt strenge MICHAELIS-MENTEN-Kinetik, wie auch aus dem linearen Verlauf im LINEWEAVER-BURK Diagramm (Abb. 5) zu entnehmen ist.
Der K_m-Wert* läßt sich aus Abb. 5 graphisch ermitteln; für jede K_m-Bestimmung wurden in der Regel 5 verschiedene Substratkonzentrationen benutzt, die normalerweise 0,65-32,5 x 10^{-4}M überstreichen. Die K_m von PGI für F-6-P (der Mittelwert von 11 unabhängigen Messungen mit verschiedenen Nachzuchten) beträgt unter Standardbedingungen $1,70 \pm 0,03 \times 10^{-4}$M; einen entsprechenden K_m-Wert haben DYSON und NOLTMANN (1968) für das gereinigte Enzym aus Kaninchenmuskel gefunden ($1,74 \pm 0,13 \times 10^{-4}$M, pH 8,5 30°C; nach den Autoren ist K_m zwischen 7,5 und 8,5 pH-unabhängig).

3.126 Bei geringen G-6-PDH-Konzentrationen war die Initialgeschwindigkeit der PGI-Reaktion von der G-6-PDH-Menge abhängig. Ab einer bestimmten Menge G-6-PDH war im Reaktionsmedium das Indikatorenzym im Überschuß vorhanden und zeigte bei weiterer Steigerung keinen Einfluß mehr auf die Initialgeschwindigkeit. Das G-6-PDH-Präparat wies nie eine meßbare PGI-Aktivität auf.

3.127 Das Standardhomogenisations- und Standardreaktionsmedium stellten wir nach den hier berichteten Daten (s. 2.31 und 2.41) zusammen.
Wird die Initialgeschwindigkeit v_o gegen die Enzymmenge aufgezeichnet, ergibt sich unter Standardbedingungen eine gerade Linie; dies zeigt, daß die Geschwindigkeit der PGI-Reaktion der Enzymmenge proportional ist (Abb. 6). Alle Messungen wurden in diesem linearen Bereich durchgeführt; wenn größere Aktivitäten zu erwarten waren, haben wir die Enzymlösung vorher entsprechend verdünnt.

---

* K_m definiert unter steady state Bedingungen nach BRIGGS und HALDANE (1925)

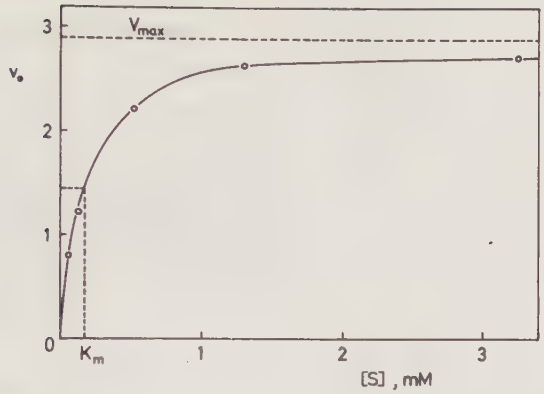

Abb. 4:

Abhängigkeit der Geschwindigkeit v_o (ΔE_{366} x 10^{-2}/min) der PGI-Reaktion vor der Substratkonzentration [S] (mM F-6-P)

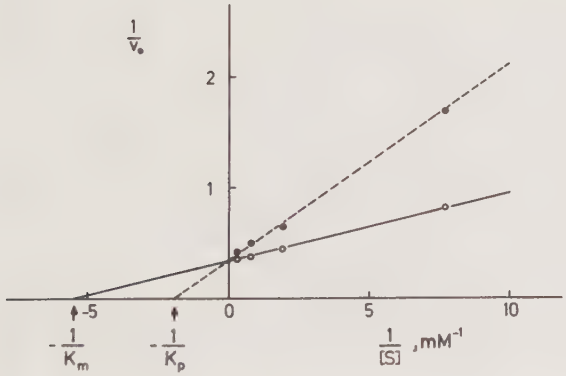

Abb. 5:

Linearisieren obiger Substratsättigungskurve nach LINEWEAVER und BURK (1934); es wird $1/v_o$ gegen $1/[S]$ aufgetragen: o—o . ●---● ist in Gegenwart von 3,25 x 10^{-4}M 6-PG aufgenommen: kompetitive Hemmung der PGI-Reaktion durch 6-PG

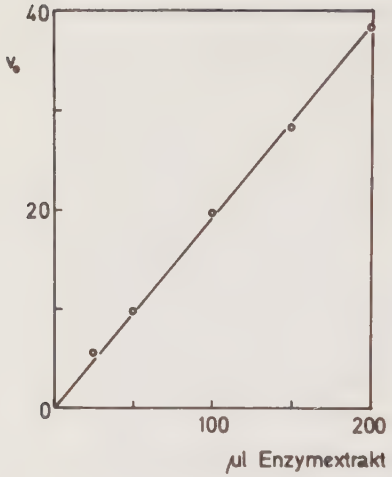

Abb. 6:

Abhängigkeit der Geschwindigkeit v_o (m/uMole F-6-P/min) der PGI-Reaktion von der eingesetzten Enzymrohextraktmenge (/ul)

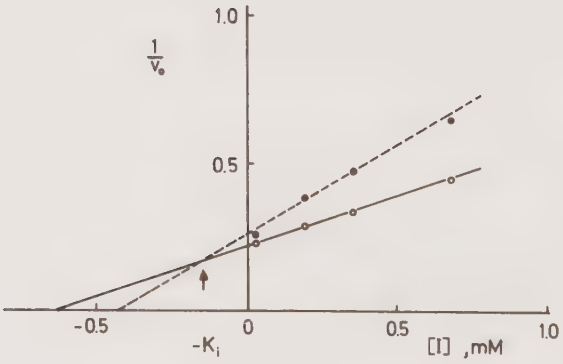

Abb. 7:

DIXON-plot. Direkte graphische Bestimmung der K_i; steigende Inhibitor-Konzentration bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen. [I] = 6-PG. ●---● 0,65 mM F-6-P, o—o 1,3 mM F-6-P

3.13 Inhibitoren

3.131 6-Phosphogluconat

Da bei der PGI-Aktivitätsbestimmung 6-PG vor dem Zeitpunkt t_o aus dem in unseren F-6-P-Präparaten als Beimengung enthaltenen G-6-P gebildet wird, haben wir diese Hemmung etwas näher untersucht. 6-PG ist als kompetitiver Hemmer der PGI bekannt (PARR 1956; NOLTMANN und BRUNS, 1959; KAHANA et al., 1960; VEITCH, 1964). Es erwies sich, daß das Enzym aus Acetabularia ebenfalls kompetitiv gehemmt wird (Abb. 5).

Das im Verlauf der Testreaktion gebildete 6-PG beeinflußt die PGI-Aktivitätsmessung nicht, da die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt t_o aus der Zeit-Umsatz-Kurve bestimmt werden kann.

Die Verminderung der Initialgeschwindigkeit durch das zum Zeitpunkt t_o schon vorhandene 6-P-Gluconat (0,03 mM beim Präparat mit 2%iger G-6-P-Beimengung) können wir graphisch bestimmen. Trägt man $1/v_o$ gegen die Inhibitorkonzentration auf, ergibt sich durch Extrapolation auf [I] = 0 die Initialgeschwindigkeit ohne Inhibitor. Die Hemmung betrug maximal (d.h. für das Präparat mit der höchsten Beimengung) 4 %; beim anderen Präparat war sie nur halb so groß. Der Gesamtverlauf der Zeitkurve (z.B. Abb. 16) wird durch die geringe Abweichung nicht beeinflußt. Eine aufwendige Reinigung des Substrates (z.B. durch Ionenaustauscher) sowie eine Korrektur der Werte waren daher nicht erforderlich.

Die Inhibitor-Konstante können wir nach

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$$

(DIXON und WEBB, 1964) mit den aus Abb. 5 graphisch ermittelten Daten berechnen: $1{,}66 \times 10^{-4}$M. DIXON (1953)

hat eine direkte graphische Bestimmung der K_i entwikkelt, mit der eine vorherige Korrektur unserer Daten möglich ist; dem Diagramm (Abb. 7) kann $K_i = 1{,}5 \times 10^{-4}$M entnommen werden. Wir konnten damit den von DYSON und NOLTMANN (1968) bei pH 8,0 bestimmten Wert von $1{,}5 \times 10^{-4}$M bestätigen. 5×10^{-6}M, das von KAHANA et al. (1960) angegeben wurde, ist wohl wegen des hohen G-6-P-Gehaltes (bis 15 %) des von ihnen verwendeten F-6-P-Präparates zu niedrig.

3.132 Mannose-6-phosphat

Bei unseren Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Zwischenprodukte des Glucose- und Mannoseweges auf die Aktivität bestimmter Schlüsselenzyme bei Acetabularia fanden wir eine Hemmung der PGI durch M-6-P. Sie konnte als kompetitive Hemmung mit einer $K_i = 3{,}4 \times 10^{-4}$M charakterisiert werden (Abb. 8).

3.14 Tagesperiodisches Verhalten der PGI-Enzymaktivität

Wie der Abb. 9 zu entnehmen ist, unterliegt die PGI-Aktivität - ganz im Gegensatz zur Rhythmik der Photosynthese (RICHTER, 1963; SCHWEIGER et al., 1964; TERBORGH und McLEOD, 1967; HELLEBUST et al., 1967) und der RNA-Synthese (VANDEN-DRIESSCHE und BONOTTO, 1969) - keinen tagesperiodischen Schwankungen. Die UDPG-Pyr*, die wir als Vergleich im selben Experiment mitverfolgt haben, steigt am Ende der Lichtperiode an. Wir haben diese Experimente vor allem deshalb durchgeführt, um Schwankungen durch Aufarbeitung bei unterschiedlicher Tageszeit auszuschließen. In der Regel wurde jedoch das Material während eines Zeitexperiments zur selben Tageszeit aufgearbeitet.

3.15 Verfälscht ein geringer Bakterienbesatz die Aussage der Experimente?

Um festzustellen, ob eine meßbare Verunreinigung unse-

* UDPG-Pyr: UDPG-Pyrophosphorylase

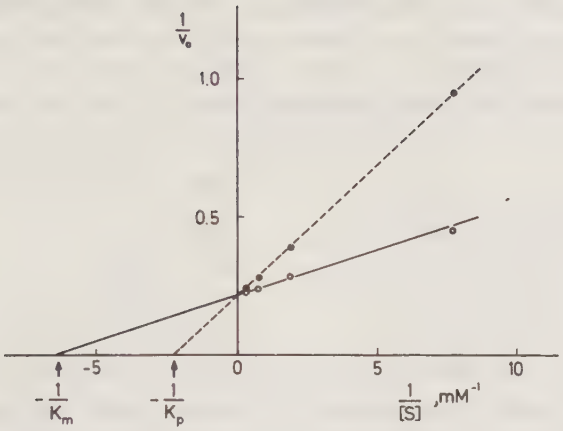

Abb. 8:

Kompetitive Hemmung der PGI-Reaktion durch M-6-P. o——o ohne Inhibitor, ●---● mit Inhibitor 0,67 mM M-6-P

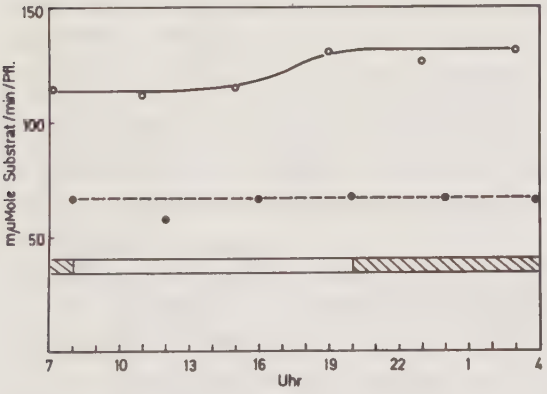

Abb. 9:

Tagesperiodisches Verhalten der Enzymaktivitäten. o——o UDPG-Pyr-Aktivität (m/uMole UDPG /min/Pfl.), ●---● PGI-Aktivität (m/uMole F-6-P /min/Pfl.). Der schraffierte Teil zeigt die Dunkelperiode, der nicht-schraffierte Teil die Lichtperiode an. Pfl.Länge 30 mm, Hut-Ø 7 mm

rer Enzymlösung mit Bakterienenzymen erfolgt, wurde die Aktivität von sorgfältig abgepinselten Pflanzen - dadurch wird der größte Teil des an sich geringen Bakterienbesatzes entfernt - mit der von unbehandelten Pflanzen verglichen. Darüber hinaus wurden die entfernten Bakterien abzentrifugiert und in gleicher Weise wie die Pflanzen auf ihre Enzymaktivität geprüft:

	m/uMole F-6-P/min/Pfl.
Kontrollpflanzen	62,5 $\pm$ 0,7
Abgepinselte Pflanzen	60,2 $\pm$ 0,2
Bakterienbesatz	1,1 $\pm$ 0,0

Daraus geht hervor, daß unter den angewendeten Bedingungen keine signifikante Verunreinigung der Enzymlösung mit Bakterienenzymen eintritt. Dieser Befund wird durch andere Fakten einwandfrei bestätigt: Die Verteilung des Enzyms in der Zelle, die Beziehungen zwischen Zelldifferenzierung und Enzymaktivität und die Tatsache, daß die Enzymsynthese in kernhaltigen Pflanzen durch Actinomycin stark gehemmt wird, in kernlosen Pflanzen sogar leicht aktiviert zu werden scheint.

3.16 Verringerung der PGI-Aktivität bei der Aufarbeitung?

Um dies zu untersuchen, haben wir einen aliquoten Teil gereinigtes Hefe-Enzym zusammen mit den Pflanzen unter den üblichen Bedingungen aufgearbeitet:

	m/uMole F-6-P/min
Hefe-Enzym-Aliquot	48,0 $\pm$ 0,3
A.med.-Enzym (mU/Pfl.)	34,6 $\pm$ 1,2
Hefe + A.med.-Enzym	86,8 $\pm$ 0,4

Wir können aus dem additiven Verhalten der beiden Enzymaktivitäten eine vollständige Rückgewinnung des Hefe-Enzyms erkennen. Die Einwände, die BETZ et al. (1968)

auf Grund ihres Modellversuches (Denaturierung von Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel durch Malat) gegen Aktivitätsbestimmungen aus Rohextrakten machten, treffen für die PGI-Aktivitätsbestimmung also nicht zu.

3.17 Vergleich der PGI-Aktivitäten junger hutloser Pflanzen und älterer Hutpflanzen bei getrennter und gemeinsamer Aufarbeitung:

	m/uMole F-6-P/min
Hutpflanze	34,6 $\pm$ 1,2
Pflanze ohne Hut	12,0 $\pm$ 0,2
Hutpflanze + Pflanze ohne Hut	48,4 $\pm$ 1,1

Aus dem additiven Verhalten der Enzymaktivitäten können wir eine Aktivierung oder Hemmung der PGI als Ursache für die Aktivitätsunterschiede bei verschiedenen Zelldifferenzierungsstadien ausschließen. Im folgenden wird noch über weitere Fakten berichtet werden, die diesen Befund untermauern.

3.2 Charakterisierung der Phosphoglucomutase

(α-D-Glucose-1,6-diphosphat: α-D-Glucose-1-phosphat phosphotransferase E.C.2.7.5.1)

3.21 CORI et al. entdeckten im Jahre 1938 dieses Enzym bei ihren Arbeiten über den Glykogenabbau. Die Reinigung und Charakterisierung gelang NAJJAR 1948. Die Aktivität der PGM wurde nach KLENOW und EMBERLAND (1955) im zusammengesetzten optischen Test gemessen, wobei das von der G-6-PDH in der Indikatorreaktion gebildete NADPH die Meßgröße ist. Die Kinetik des Tests ist im Proportionalitätsbereich unter Standardbedingungen mindestens 10 min linear.

Vieles von dem, was unter 3.1 für die PGI gesagt wurde, gilt auch für die PGM; wir verweisen auf diesen Abschnitt.

Die von uns verwendeten G-1-P-Präparate wiesen keine meßbaren G-6-P-Beimengungen auf. Auch die PGM wird nach BOT (1958) durch 6-PG gehemmt; das im Verlauf der Testreaktion gebildete 6-PG beeinflußt jedoch die PGM-Aktivitätsmessung nicht, da wir die Initialgeschwindigkeit v_o messen.

3.22 Optimalisieren von Homogenisations- und Reaktionsmedium

Als Grundlage diente das von ZETSCHE (1966 e) verwendete Homogenisations- und Reaktionsmedium.

3.221 Unter den getesteten Puffersystemen konnten wir mit Tris und GOOD-Puffern nur verschwindend geringe Aktivitäten erhalten. TRAP pH 7,6 50 mM im Homogenisationsmedium und Imidazol-Puffer pH 7,8 40 mM im Reaktionsmedium erbrachten die besten Ergebnisse.

3.222 Cystein wurde nicht benötigt. EDTA (5 mM) mußte im Homogenisationsmedium zugegeben werden.

3.223 Beim Zusetzen von Triton-x-100 zum Homogenisat

% Triton (v/v)	PGM-Aktivität (mµMole G-1-P/min/Pfl.)
0	38,9
0,5	91,6
1,0	95,8
2,0	102,6
4,0	85,4

wurde die Aktivität auf das 2,5-fache erhöht.

3.224 $NADP^+$-Konzentration: 0,53 mM im Reaktionsmedium. Das G-6-PDH-Präparat wies nie eine meßbare PGM-Aktivität auf.

3.225 Einen bemerkenswerten Anstieg der PGM-Aktivität bewirken Mg^{2+}-Ionen im Reaktionssystem (Abb. 10). Nach NAJJAR (1962) soll Mg^{2+} zusammen mit Imidazol - nach vorheri-

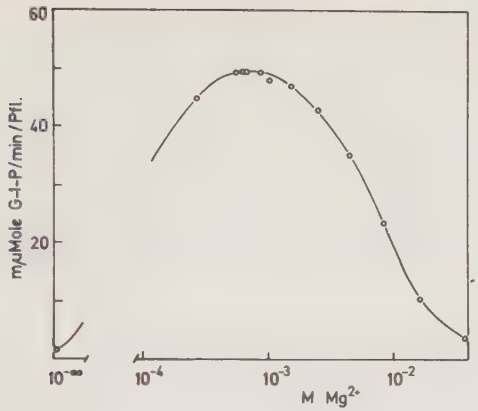

Abb. 10:

Abhängigkeit der PGM-Aktivität von der Mg^{2+}-Ionenkonzentration im Reaktionsmedium

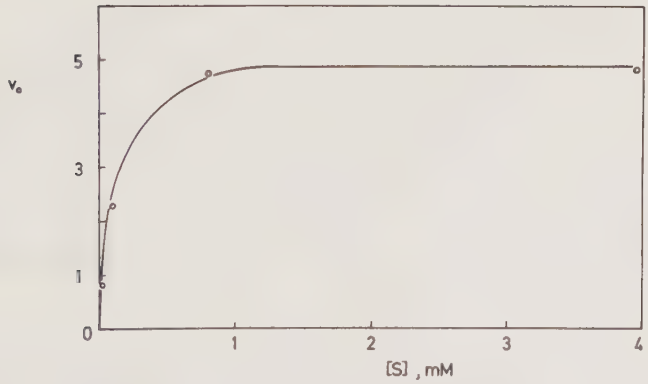

Abb. 11:

Substratsättigungskurve der PGM-Reaktion bei niedriger Substratkonzentration (mM G-1-P). v_o (ΔE_{366} x 10^{-2}/min). G-1,6-diP 6,7 x 10^{-4}M

ger Inkubation - eine höhere PGM-Aktivität bewirken; die maximale Aktivierung soll bei $0^{o}C$ innerhalb von 10 bis 20 min erreicht sein. Wir haben daher in einem Medium: 40 mM Imidazol pH 7,5, 1 mM $MgSO_4$ und 1 % Triton-x-100 homogenisiert. Sofort nach der Aufarbeitung und nach weiteren 45 min Inkubation bei $0^{o}C$ fanden wir gleiche Aktivitäten. Diese Aktivitäten waren jedoch um die Hälfte niedriger als die unter Standardbedingungen gemessenen.

3.226 Die PGM-Reaktion gehorcht bei niedrigen Substratkonzentrationen der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung (Abb. 11), bei höheren G-1-P-Konzentrationen sinkt jedoch die Geschwindigkeit v_o wieder: Substrathemmung (Abb. 12); s.a. JOSHI und HANDLER, 1964). Die "apparent" K_m ist trotzdem bestimmbar, obwohl V_{max} nicht erreicht wird (DIXON und WEBB, 1964; MAHLER und CORDES, 1966), da wir ja beim doppelt reziproken Diagramm auf V_{max} extrapolieren können (Abb. 13).

Beim komplizierten Mechanismus der PGM-Reaktion ("ping-pong"-Mechanismus nach CLELAND, 1963) können die Werte, die man für K_m ableitet, nicht in der üblichen Weise interpretiert werden. Die "apparent" MICHAELIS-Konstanten für G-1-P und G-1,6-diP variieren ziemlich stark mit den relativen Konzentrationen der beiden Verbindungen (s. Legenden zu den Abb. 12 und 13; NAJJAR, 1962; für eine quantitative Behandlung s. RAY und ROSCELLI, 1964), da sie miteinander kompetieren.

3.227 Für das Erreichen maximaler Aktivitäten sind verhältnismäßig hohe G-1,6-diP-Konzentrationen nötig (Abb. 14). Bei diesen Konzentrationen liegen dann wahrscheinlich alle Enzyme als Phosphor-Enzym vor; ab 10^{-4}M G-1,6-diP findet eine Hemmung statt.

3.228 Als Ergebnis der in diesem Abschnitt geschilderten Daten erfolgte die Zusammenstellung des Standardhomogenisations- und Standardreaktionsmediums (s. 2.32, 2.42). Un-

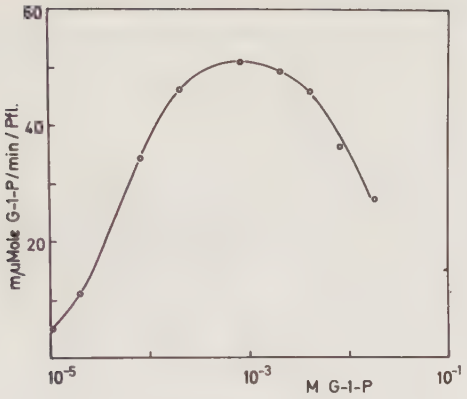

Abb. 12:

Abhängigkeit der PGM-Aktivität von der Substratkonzentration; G-1,6-diP 1,4 x 10^{-6}M. "apparent" K_m ca. 5 x 10^{-5}M

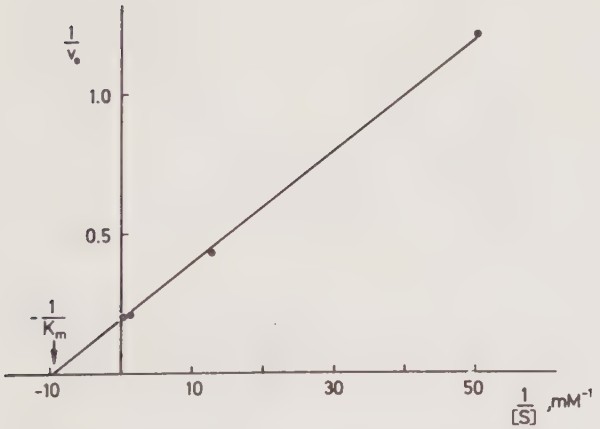

Abb. 13:

LINEWEAVER-BURK-plot. Daten wie in Abb. 11. G-1,6-diP 6,7 x 10^{-4}M. "apparent" K_m = 1 x 10^{-4}M

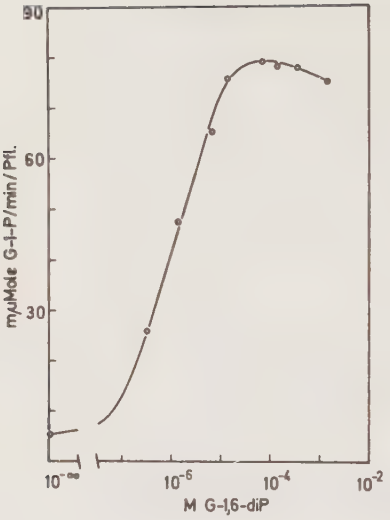

Abb. 14:

Einfluß der G-1,6-diP-Konzentration (M) auf die PGM-Aktivität bei konstanter G-1-P-Konzentration (8 x 10^{-4}M)

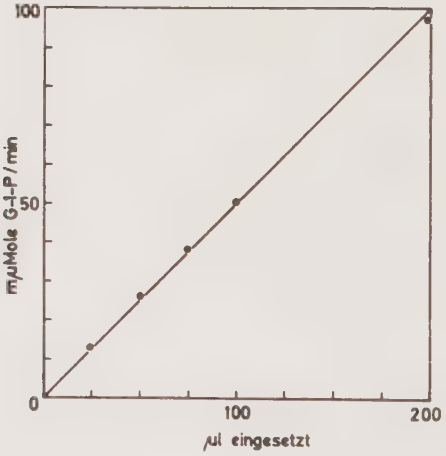

Abb. 15:

Abhängigkeit der PGM-Aktivität von der eingesetzten PGM-Menge (μl Enzymrohextrakt)

ter Standardbedingungen ist die Geschwindigkeit der PGM-Reaktion der Enzymmenge proportional (Abb. 15).

3.23 Bakterienbesatz (s. 3.15)

	m/uMole G-1-P/min/Pfl.
Kontrollpflanzen	115,2 ± 1,8
Abgepinselte Pflanzen	119,1 ± 3,4
Bakterienbesatz	0,5 ± 0,0

Aus der Tabelle folgt, daß keine signifikante Verunreinigung der Enzymlösung mit Bakterienenzymen eintritt.

3.24 Verringerung der PGM-Aktivität bei der Aufarbeitung?

Dazu haben wir ein Aliquot gereinigtes Enzym aus Kaninchenmuskel zusammen mit den Pflanzen unter Standardbedingungen aufgearbeitet:

	m/uMole G-1-P/min
Kaninchenmuskel-Enzym-Aliquot	61,4 ± 0,5
A.med.-Enzym (pro Pfl.)	50,1 ± 0,8
Kaninchenmuskel- + A.med.-Enzym	112,2 ± 2,1

Wir können aus dem additiven Verhalten der beiden Enzymaktivitäten eine Verringerung der PGM bei der Aufarbeitung ausschließen.

3.25 Vergleich der PGM-Aktivitäten bei hutlosen Pflanzen und Hutpflanzen bei getrennter und gemeinsamer Aufarbeitung:

	m/uMole G-1-P/min
Hutpflanze	50,1 ± 0,8
Pflanze ohne Hut	39,6 ± 0,6
Hutpflanze + Pflanze ohne Hut	88,8 ± 1,3

3.3 Verhalten der PGI- und PGM-Aktivität im Verlauf der Morphogenese kernhaltiger und kernloser Pflanzen

3.31 Kernhaltige Stielhinterstücke

Solche Hinterstücke regenerieren zuerst Stiel und Wirtel, bevor sie einen Hut bilden. Bei ihnen ist die Hutbildung besser synchronisiert als bei ganzen Pflanzen (vgl. Abb. 16 mit Abb. 21).

Das Verhalten der UDPG-Pyr ist von ZETSCHE (1968 a) genauestens beschrieben worden; er konnte eine enge Korrelation zwischen Hutbildung und UDPG-Pyr-Aktivität nachweisen: die Aktivität des Enzyms steigt zu Beginn der Hutbildung stark an. Wie wir nun weiter zeigen konnten, ist die Zunahme der UDPG-Pyr-Aktivität eng mit dem Wachstum des Hutes verbunden, d.h. der Hutdurchmesser nimmt im selben Maß wie die UDPG-Pyr-Aktivität zu. Wir können diesen verstärkten Anstieg geradezu als Parameter der Synthese gewisser Hutpolysaccharide betrachten.

Der Abb. 16 ist weiter zu entnehmen, daß zwischen Hutbildung und PGI-Aktivität keine Korrelation besteht. Besonders deutlich wird der Unterschied im Verhalten der beiden Enzyme, da sie an der gleichen Pflanzenpopulation getestet wurden: der Anstieg der PGI-Aktivität ist im ganzen gesehen viel geringer als der der UDPG-Pyr-Aktivität und ist wie der des Gesamtproteins linear.

Bei Acetabularia mediterranea folgt nach HÄMMERLING et al. (1958) auf eine exponentielle eine lineare Volumenzunahme, was sich in einem exponentiellen bzw. linearen Proteinanstieg ausdrückt. Alle geschilderten Zeitexperimente erfolgten in diesem linearen Bereich, da wir am Tag 0 immer von älteren Pflanzen (i. allg. 20 bis 30 mm lang, die nach 2.2 entsprechend vorbehandelt wurden) und nie von Keimlingen ausgingen.

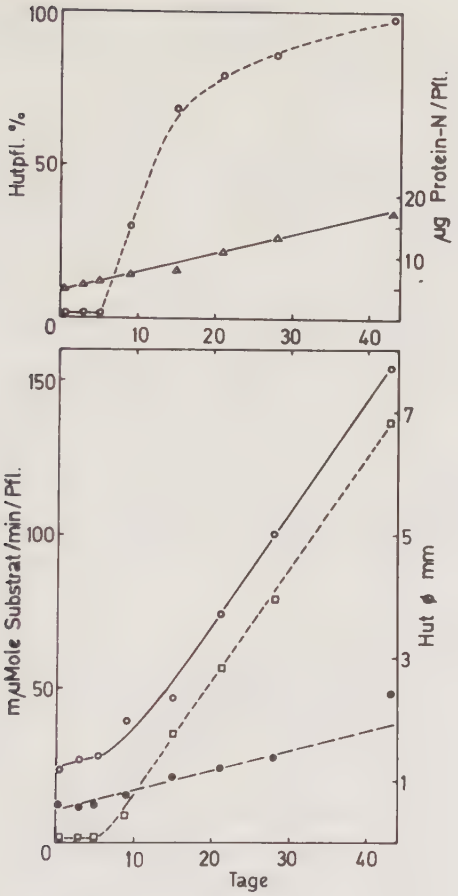

Abb. 16:

PGI- (mµMole F-6-P/min/Pfl.) und UDPG-Pyr-Aktivität (mµMole UDPG/min/Pfl.) in kernhaltigen Stielhinterstücken. o—o UDPG-Pyr-Aktivität, ●--● PGI-Aktivität, □----□ Hutdurchmesser in mm, bezogen auf die Gesamtpopulation, ▲—▲ µg Protein-N/Pfl., o---o % Hutpflanzen.

Aus Abb. 16 und den folgenden Abbildungen geht hervor, daß beim Übergang von der Stiel- zur Hutbildung - wie schon CLAUSS (1962) feststellte - keine Erhöhung der Gesamtproteinsyntheserate einsetzt. Nach zahlreichen Experimenten wurde deutlich, daß die PGI-Aktivität nicht nur wie das Gesamtprotein linear ansteigt, sondern auch immer die gleiche Steigung wie letzteres aufweist. Ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich beim Anstieg der PGI-Aktivität um eine Neusynthese des Enzyms und nicht nur um eine Aktivierung (s. 3.17) handelt.
Wir können den Anstieg der PGI-Aktivität als Parameter des Wachstums der Pflanze betrachten, das durch die Gesamtproteinsyntheserate gekennzeichnet ist.

Eine enge Korrelation zwischen Hutbildung und PGM-Aktivität ist den Abb. 17 und 18 zu entnehmen; die PGM-Aktivität nimmt mit Beginn der Hutbildung stark zu, wenn auch nicht in so starkem Ausmaß wie die UDPG-Pyr-Aktivität.

Das Verhalten der spezifischen Aktivität während der Morphogenese hebt das bisher Gesagte besonders klar hervor. Die spezifische Aktivität der PGI bleibt über die ganze Untersuchungszeit konstant, die Hutbildung hat auf sie keinen Einfluß (Abb. 19). Bei hutlosen Pflanzen nimmt die spezifische Aktivität der PGM und der UDPG-Pyr zuerst ab, erreicht zu Beginn der Hutbildung den niedrigsten Wert um dann mit Beginn der linearen Zunahme des Hutdurchmessers stark anzusteigen (Abb. 19 und 20).

3.32 Ganze Pflanzen

Trotz verminderter Synchronisation der Hutbildung im Vergleich zu kernhaltigen Hinterstücken fanden wir auch mit diesem Material im Prinzip die gleiche Tendenz der unter 3.31 beschriebenen Verhältnisse (Abb. 21). Durch das Zurückschneiden der Pflanzen treten also keine Artefakte auf.

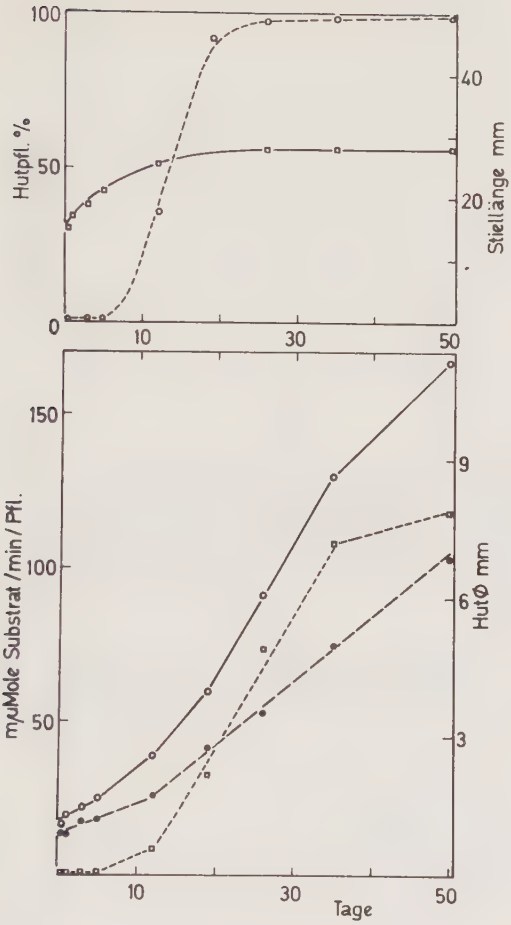

Abb. 17:

PGM- (mμMole G-1-P/min/Pfl.) und UDPG-Pyr-Aktivität (mμMole UDPG/min/Pfl.) in kernhaltigen Stielhinterstücken. ●---● PGM-Aktivität, □—□ Stiellänge in mm, die anderen Symbole wie in Abb. 16

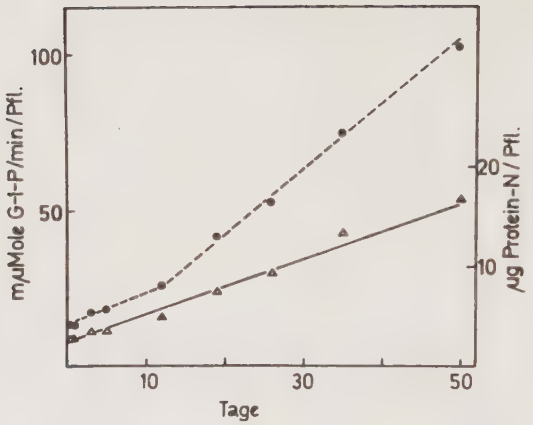

Abb. 18:

Die PGM-Aktivität nimmt nach der Hutbildung stärker als die Gesamtproteine zu. Gleiches Experiment wie in Abb. 17 dargestellt. ●---● PGM-Aktivität, △—△ Protein-N/Pfl. Letztere Kurve entspricht dem PGI-Aktivitätsverlauf

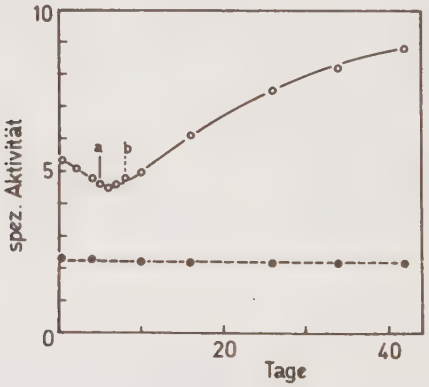

Abb. 19:

Spezifische Aktivität der PGI (m/uMole F-6-P /min/ug Protein-N) und der UDPG-Pyr (m/uMole UDPG/min/ug Protein-N). Die Daten sind aus Abb. 16 erhalten. a: Beginn der Hutbildung; b: Beginn der linearen Zunahme des Hutdurchmessers. ●---● spez. PGI-Aktivität, o—o spez. Aktivität der UDPG-Pyr

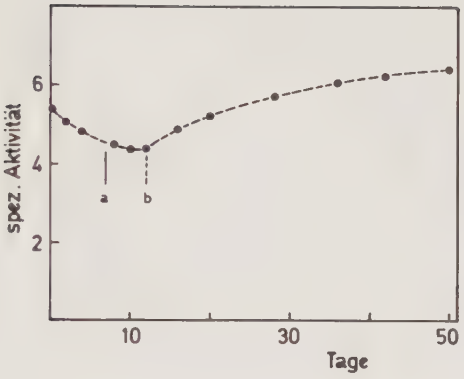

Abb. 20:

Spezifische Aktivität der PGM (m/uMole G-1-P /min/ug Protein-N). Die Daten sind aus Abb. 17 erhalten; a, b s. Legende zu Abb. 19; ●---● spez. PGM-Aktivität

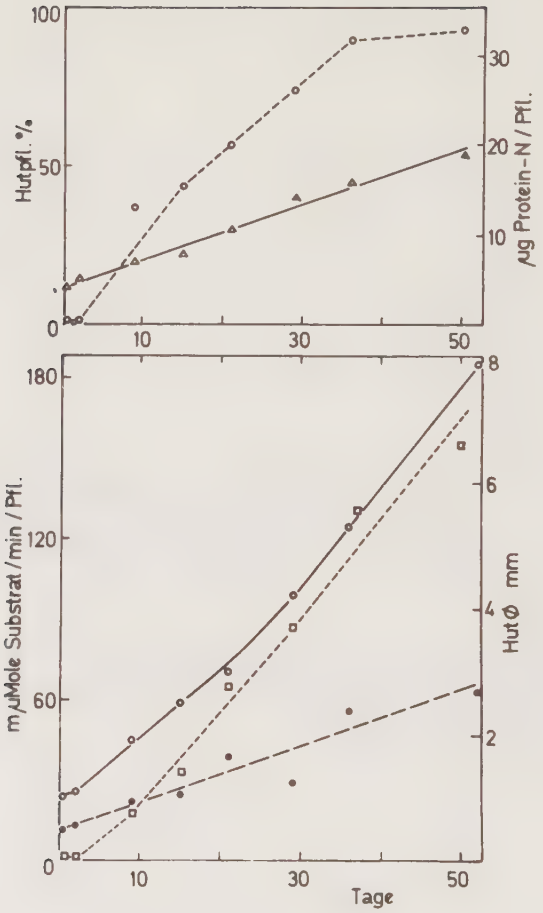

Abb. 21:

PGI- (m µMole F-6-P/min/Pfl.) und UDPG-Pyr-Aktivität (m µMole UDPG/min/Pfl.) ganzer Pflanzen. Ausgangslänge 22 mm. Symbole wie in Abb. 16

3.33 Kernlose Pflanzen

Wie schon erwähnt, sind solche Pflanzen zu einer beträchtlichen Stiel- und Hutbildung befähigt. Bei diesen kernlosen Zellen traten Beziehungen auf, wie wir sie schon von kernhaltigen Zellen kennen. Abb. 22 zeigt die Verhältnisse für UDPG-Pyr und PGI. Mit Beginn der Hutbildung ist, wie ZETSCHE (1968 a) schon früher zeigte, eine starke Zunahme der UDPG-Pyr-Aktivität zu verzeichnen. Die PGI-Aktivität steigt wieder wie das Gesamtprotein linear an. Nach etwa 30 Tagen stellt jedoch die kernlose Pflanze ihr Wachstum ein, was sich in einem Plateau des Gesamtproteins manifestiert. Bei Stillstand der Gesamtprotein-Nettosynthese ist auch kein weiterer Anstieg der PGI-Aktivität zu verzeichnen. Die PGM-Aktivität weist in kernlosen Pflanzen wieder die enge Korrelation mit der Hutbildung auf; ihre Zunahme ist ebenfalls etwas geringer als die der UDPG-Pyr (Abb. 23).

Die Aktivitätszunahme ist in kernlosen Zellen geringer als in kernhaltigen. Das ist zu erwarten, da der Prozentsatz der Hutpflanzen geringer ist; weiterhin sind die gebildeten Hüte nicht so groß. Dies drückt sich auch in einem geringeren Proteinzuwachs aus.

3.34 Einfluß von Puromycin auf kernhaltige Hinterstücke

Da wir Enzymaktivitäten messen, bleibt nachzuweisen, ob der Anstieg der PGM-Aktivität zum Zeitpunkt der Hutbildung auf eine vermehrte Synthese des Enzyms oder nur auf eine Aktivierung schon vorhandener Enzymmoleküle zurückzuführen ist. Es wurden deshalb Experimente mit dem Antibiotikum Puromycin durchgeführt, das recht spezifisch die Proteinsynthese hemmt (NATHANS, 1964; HARTMANN et al., 1968). 30 µg/ml Puromycin bewirken bei den Acetabularien eine völlige Hemmung der Proteinsynthese und der Morphogenese, die jedoch reversibel ist (ZETSCHE, 1965, 1966 b). Wir setzten das Antibioti-

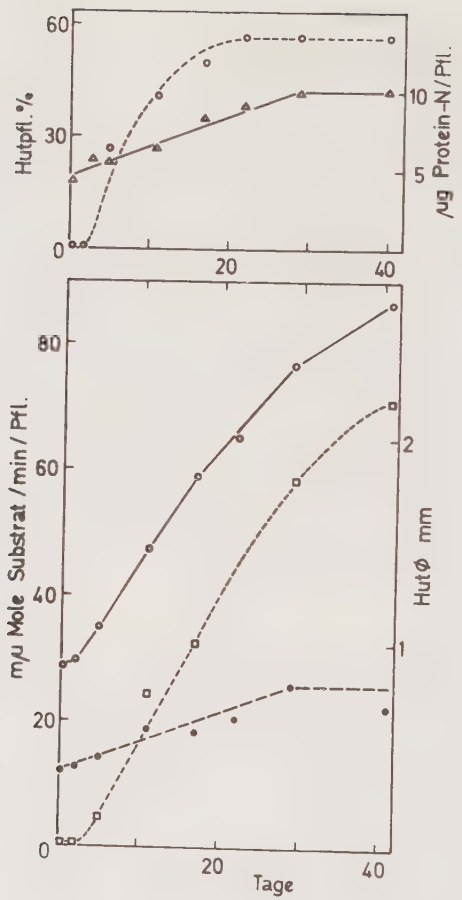

Abb. 22:

PGI- (m/uMole F-6-P/min/Pfl.) und UDPG-Pyr-Aktivität (m/uMole UDPG/min/Pfl.) kernloser Pflanzen. Ausgangslänge 25 mm. Symbole wie in Abb. 16

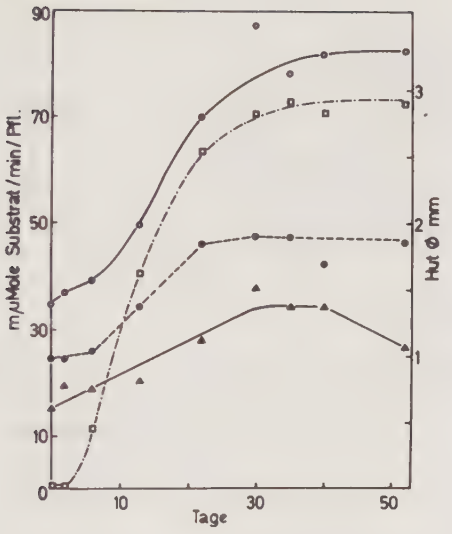

Abb. 23:

PGI- (mμMole F-6-P/min/Pfl.), PGM- (mμMole G-1-P/min/Pfl.) und UDPG-Pyr-Aktivität (mμMole UDPG/min/Pfl.) in kernlosen Pflanzen (gleiche Pflanzenpopulation!). o—o UDPG-Pyr-, ●---● PGM-, ▲—▲ PGI-Aktivität, □-·-□ Hut-Ø in mm

kum dem Kulturmedium der Pflanzen etwa zu Beginn der Hutbildung, d.h. auch zu Beginn des PGM-Aktivitätsanstieges, zu. Stiel- und Hutbildung sowie die Zunahme der Aktivität werden sofort gestoppt (Abb. 24). Die PGM-Aktivität bleibt während der Behandlungsdauer konstant; die PGM ist demnach ein relativ stabiles Enzym. Nach Übertragung der Pflanzen in neues, antibiotikumfreies Kulturmedium erfolgt nach einer lag-phase ein starker Anstieg der PGM-Aktivität. Dieser Anstieg ist der Zunahme des Hutdurchmessers parallel. Da Puromycin den Anstieg der Enzymaktivität hemmt, kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Neusynthese des Enzyms bei der Aktivitätszunahme geschlossen werden; diesen Befund haben schon die unter 3.25 berichteten Daten nahegelegt.

Die PGI-Aktivität wird durch Puromycin ebenfalls gehemmt (Tab. 1); ein zusätzlicher Hinweis dafür, daß die PGI-Aktivität mit der Proteinsynthese korreliert ist und es sich daher bei der Zunahme der PGI-Aktivität um eine de novo-Synthese des Enzyms handelt.

3.35 Einfluß von Actinomycin D

10 /ug Actinomycin D /ml Kulturmedium beeinflussen die Stiel- und Hutbildung kernloser Pflanzen kaum, weil die dafür benötigten m-RNA's im wesentlichen in den vorderen Teilen der Zelle gespeichert sind (ZETSCHE, 1964). Die gleiche Actinomycinmenge scheint bei kernlosen Pflanzen die PGI-Aktivität gegenüber den Kontrollpflanzen sogar etwas zu erhöhen (Abb. 25 b). Auf die PGM-Aktivität hat sie keinen Einfluß, wenigstens nicht innerhalb der ersten 15 Tage (Abb. 25 a). Daß sich am 25. Tag eine gewisse Benachteiligung (ca. 20 %) der mit Actinomycin behandelten Pflanzen gegenüber der Kontrolle einstellt, ist ganz verständlich, da bei ersteren sich jetzt Sekundäreffekte - wie z.B. die durch die Blockierung der Chloroplasten-DNA bedingte Reduktion

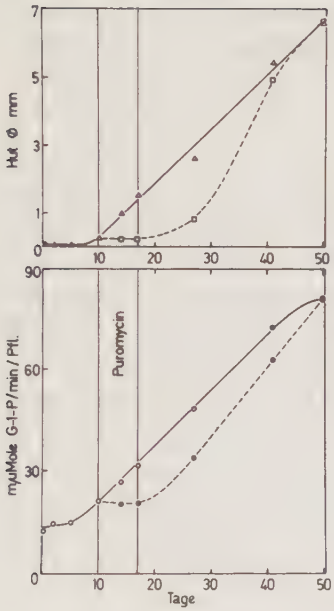

Abb. 24:

Einfluß von Puromycin auf die PGM-Aktivität in kernhaltigen Hinterstücken. Zwischen d 10 und d 17 wurden die Zellen 30 µg/ml Puromycin ausgesetzt. Danach kamen sie nach mehrmaligem Waschen wieder in normales Kulturmedium. Die Kontrollpflanzen blieben immer in normalem Kulturmedium. o—o Enzymaktivität der Kontrollpflanzen, ●---● Enzymaktivität der mit Puromycin behandelten Pflanzen, Δ—Δ Hutdurchmesser der Kontrollpflanzen, □---□ Hutdurchmesser der mit Puromycin behandelten Pflanzen.

Tab. 1: Einfluß von Puromycin auf die PGI-Aktivität in kernhaltigen Hinterstücken

Die Pflanzen wurden 7 Tage lang 30 µg/ml Puromycin ausgesetzt. Danach kamen sie nach mehrmaligem Waschen wieder in normales Kulturmedium. Die Kontrollpflanzen blieben immer in normalem Kulturmedium.

	mµMole F-6-P/min/Pfl.	
	Kontrolle	behandelte Pflanzen
vor Puromycin-Gabe	17,6 ± 0,3	-
nach 7 d in Puromycin	26,6 ± 0,6	15,3 ± 0,2
nach weiteren 33 d in normalem Medium	41,5 ± 2,3	45,3 ± 1,3

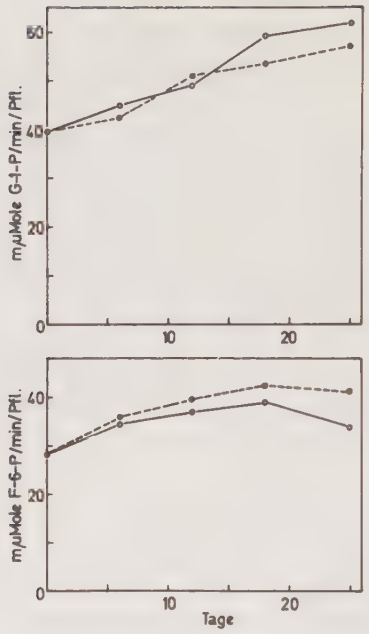

Abb. 25:

Einfluß von Actinomycin D auf die

a) PGM-Aktivität und die
b) PGI-Aktivität kernloser Pflanzen.

o—o Enzymaktivität der Kontrollpflanzen,
●---● Enzymaktivität der mit Actinomycin D behandelten Pflanzen.

Tab. 2: Einfluß von Actinomycin D (10 ug/ml Kulturmedium) auf die PGM-Aktivität in kernhaltigen Hinterstücken. Länge am Tag 0 18 mm.

	m/uMole G-1-P/min/Pfl.	
	Kontrolle	behandelte Pflanzen
Tag 0	17,8 ± 0,6	-
Tag 25	52,9 ± 2,3	28,7 ± 1,0

des Photosyntheseapparates - bemerkbar machen. Es gibt elektronenmikroskopische Beobachtungen von WERZ (1966), wonach in kernlosen Acetabularia-Zellen die Ausbildung von Thylakoiden in den Chloroplasten durch Actinomycin gehemmt wird.

Bei kernhaltigen Hinterstücken beträgt die Hemmung der PGM-Aktivität jedoch 70 % (Tab. 2). Daß die Hemmung nicht vollständig ist, beruht auf der Wahl unseres Materials: die Pflanzen sind mit 18 mm schon etwas zu groß und haben - durch den m-RNA-Gradienten der intakten Pflanze bedingt - eine gewisse m-RNA-Konzentration zur Verfügung, die für den geringen Anstieg der PGM-Synthese in Gegenwart von Actinomycin verantwortlich ist.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß auch Pflanzen, die erst zu einer Stiellänge von 12 bis 15 mm ausgewachsen sind, nach Kernentfernung bereits in der Lage sind, teilweise einen Hut zu bilden (BETH, 1953).

3.4 Unterschiedliche Synthese der Enzyme in den verschiedenen Zellregionen

3.41 Acetabularia weist eine typische Spitzen-Basis-Polarität auf (Lit. in HÄMMERLING, 1963). ZETSCHE (1969 a) konnte für die UDPG-Pyr-Aktivität einen Gradienten nachweisen: in der Spitze der Zelle ist die Aktivität des Enzyms viel größer als in der Basis. Diese unterschiedliche Verteilung beruht auf einer verstärkten Synthese des Enzyms in der apikalen Region (ZETSCHE, 1969 a; s. dort auch genauere Angaben zur Methode).

3.42 Wie verhalten sich diesbezüglich PGM und PGI?

Alle drei Enzyme wurden mit gleicher Nachzucht, also gleichem Pflanzenmaterial, nebeneinander untersucht; wir können so die verschiedenen Enzymaktivitäten direkt miteinander vergleichen. Zu Beginn des Versuchs (Tag 0) -

zeigen PGM und PGI wie UDPG-Pyr hinsichtlich der spezifischen Aktivität einen stark ausgeprägten apikal-basalen Gradienten (Abb. 26). Der Gradient ist noch stärker ausgeprägt, wenn wir die Enzymaktivitäten nicht auf Gesamtprotein, sondern auf Pflanzenteil beziehen (Abb. 27); die höchste Enzymaktivität tritt in den apikalen Zellteilen auf, zum basalen Ende hin nimmt die Enzymaktivität ab. Um Artefakte durch das Zerschneiden auszuschließen, wurde zum Vergleich die Aktivität von Zellen bestimmt, denen nur das Rhizoid abgeschnitten worden war. Die Enzymaktivität dieser Zellen entspricht der Summe der Aktivitäten der Einzelteile (als Beispiel diene Tab. 3).

Werden die Teile 20 bis 30 Tage weiterkultiviert, so nimmt bei PGM und UDPG-Pyr die Enzymaktivität am stärksten in den Vorderstücken zu (Abb. 27). Auch die Proteinzunahme ist nach dieser Kulturdauer in den Vorderstücken größer als in den Mittel- und Hinterstücken (Tab. 4); da allerdings die Aktivitätszunahme der PGM und der UDPG-Pyr die Proteinzunahme übertrifft, finden wir in den Vorderstücken eine stärkere Zunahme der spezifischen Aktivität.

Bei der PGI liegen die Verhältnisse anders:
In den Vorderstücken übertrifft die Proteinzunahme die PGI-Aktivitätszunahme merklich (vgl. Tab. 4 mit Tab. 3), was sich in einem Absinken der spezifischen Aktivität ausdrückt. Die Vorderstücke werden von den Mittelstükken und Hinterstücken in der spezifischen Aktivität weit übertroffen, und letztere zeigen eine Zunahme der spezifischen Aktivität (Abb. 26 c): Umkehrung des Gradienten in den isolierten Teilstücken.
Die hier erwähnten Fakten stimmen mit den unter 3.31 geschilderten ausgezeichnet überein. Errechnen wir die Zunahme der PGI-Aktivität und des Gesamtproteins für ganze kernlose Pflanzen aus den Daten für die einzelnen Teile aus den Tab. 3 und 4, so nimmt die PGI-Aktivität in 26 Tagen genau wie das Gesamtprotein um 56 % zu.

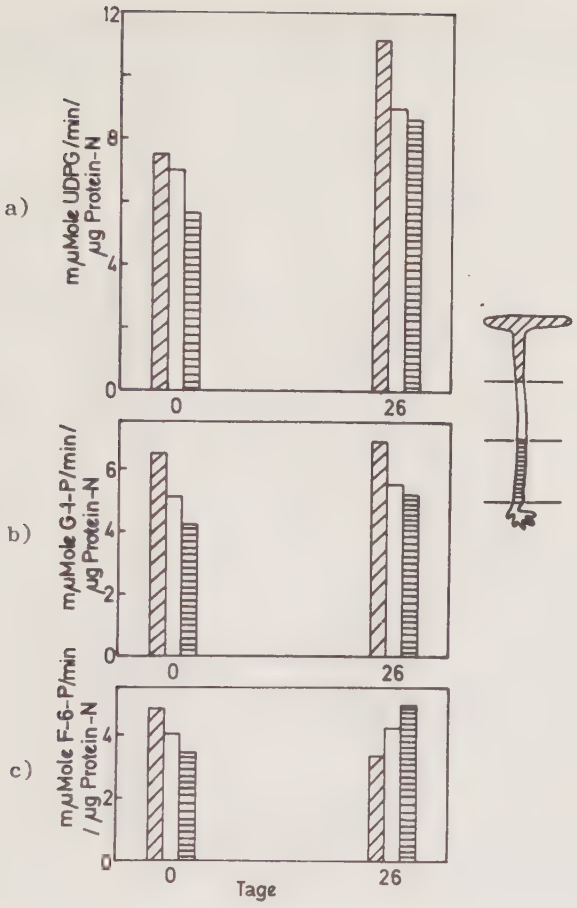

Abb. 26:

Spezifische Enzymaktivität (m µMole Substrat /min/ µg Protein-N) der a) UDPG-Pyr b) PGM und c) PGI in verschiedenen Zellregionen. Durch Zerschneiden werden die Zellen in möglichst gleich große Teilstücke zerlegt, und zwar in Vorder-, Mittel- und Hinterstücke ohne Rhizoid. Die Schnitte sind in der Abb. schematisch am rechten Rand durch waagrechte Striche dargestellt:

▨ Vorder-

□ Mittel-

▤ Hinterstücke

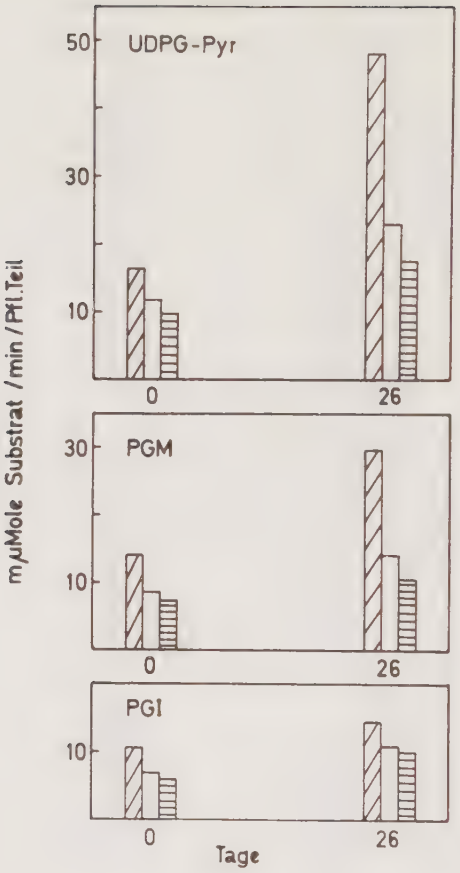

Abb. 27:

PGI- (m µMole F-6-P/min/Pfl.Teil), PGM- (m µMole G-1-P/min/Pfl.Teil) und UDPG-Pyr-Aktivität (m µMole UDPG/min/Pfl.Teil) in verschiedenen Zellregionen. Gleiches Experiment wie in Abb. 26, s. dort die Symbole. Pflanzenmaterial: Ausgangslänge der Pflanzen vor dem Zerschneiden 32 mm. Am d o haben 19,5 % der Vorderstücke Hüte. Mittel- und Hinterstükke zeigen auch nach 26d keine Hutbildung; 62 % der Vorderstücke haben am d 26 Hüte

Tab. 3: PGI-Aktivität verschiedener Zellregionen während der Morphogenese (Daten von dem in Abb. 26 und 27 wiedergegebenen Experiment)

	m/uMole F-6-P/min/Pfl.teil		Aktivitätszunahme in %
	Tag 0	Tag 26	
Vorderstücke	10,5 ± 0,3	14,5 ± 0,1	38
Mittelstücke	6,8 ± 0,3	10,8 ± 0,2	60
Hinterstücke	5,9 ± 0,5	10,1 ± 0,2	71
Pflanzen ohne Rhizoid	21,1 ± 0,7	33,1 ± 0,6	57

Tab. 4: Proteingehalt verschiedener Zellregionen (Daten von dem in Abb. 26 und 27 wiedergegebenen Experiment)

	/ug Protein-N/Pflanzenteil		Proteinzunahme in %
	Tag 0	Tag 26	
Vorderstücke	2,17 ± 0,07	4,30 ± 0,08	98
Mittelstücke	1,68 ± 0,09	2,55 ± 0,05	52
Hinterstücke	1,72 ± 0,07	2,03 ± 0,05	18

Auf die Gesamtpflanze bezogen ist die spezifische PGI-Aktivität also konstant (s. Abb. 19).

Bei Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die Enzymaktivität auf /ug Protein-N bezogen; zu prinzipiell den gleichen Ergebnissen gelangt man, wenn man z.B. die PGM-Aktivität auf lösliche Proteine bezieht.

3.43 Worauf beruht der Gradient?

a) Auf unterschiedlicher Synthese oder b) auf unterschiedlicher Aktivierung bzw. Inhibition der Enzyme in den verschiedenen Zellregionen?
Gegen b) sprechen folgende Experimente, die sowohl für PGI als auch für PGM durchgeführt wurden. Der Übersicht halber geben wir jeweils nur Daten für ein Enzym an:

3.431 Für alle drei Enzyme haben wir sowohl am Tag 0 als auch am Tag 26 von den Vorder-, Mittel- und Hinterstücken die MICHAELIS-Konstanten bestimmt. Die K_m-Werte eines Enzyms stimmen innerhalb der Fehlergrenzen gut überein. Von der Vielzahl der Experimente ist ein repräsentatives Beispiel ausgewählt (Abb. 28).

3.432 Vom Homogenisat der Hinterstücke wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dies sei jetzt am Beispiel der PGM illustriert (Abb. 29): es besteht eine exakte lineare Beziehung zwischen eingesetzter Enzymrohextrakt-Menge und Geschwindigkeit v_o der PGM-Reaktion. Das Herausverdünnen eines Inhibitors müßte eine Nicht-Linearität ergeben.

3.433 Weiter wurden die Homogenisate von Vorder- und Hinterstücken 20 h bei 4°C gegen Homogenisationspuffer dialysiert. Trotz eines gewissen Absinkens der Enzymaktivitäten blieben die Aktivitätsunterschiede genau erhalten. Fast identische Ergebnisse erhielten wir, wenn wir die Proben 20 h bei 4°C lagerten:

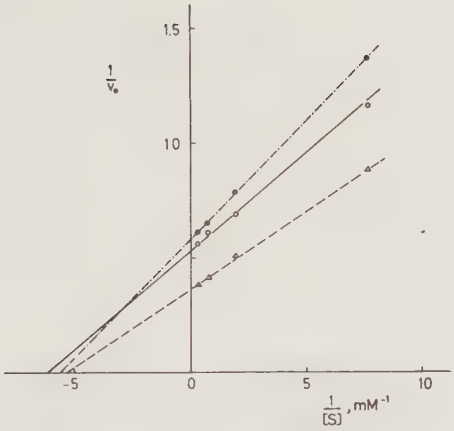

Abb. 28:

K_m-Bestimmung der PGI für F-6-P von Vorder-, Mittel- und Hinterstücken am Tag 0 (Experiment wie in Abb. 26 und 27). △---△ PGI-Aktivität der Vorder-, o——o Mittel- und ●-·-● Hinterstücke

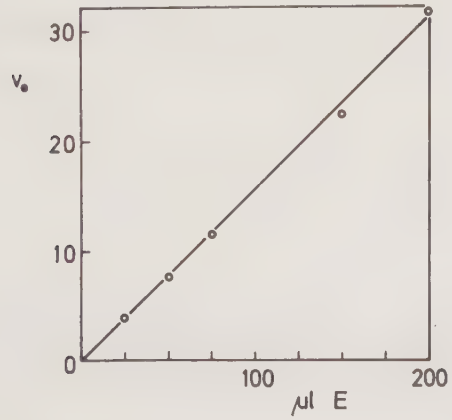

Abb. 29:

Lineare Beziehung zwischen eingesetzter Enzymrohextraktmenge (µl) und Geschwindigkeit v_o der PGM-Reaktion (m/uMole G-1-P/min^o)

	PGI-Aktivität m/uMole F-6-P/min pro Vorderstück	Hinterstück
t_o	12,7	6,2
nach 20 h Dialysieren	6,8	3,6
t_o	13,2	6,2
nach 20 h Lagern	8,5	3,8

Aus einem Vergleich ersehen wir, daß der Gradient nicht durch einen niedermolekularen Inhibitor oder Aktivator - unterschiedlich in der Zelle verteilt - entstehen kann.

3.434 Vorderstücke und Hinterstücke wurden einmal getrennt und einmal gemeinsam homogenisiert:

	PGI-Aktivität m/uMole F-6-P/min
Vorderstück	13,1 $\pm$ 0,9
Hinterstück	6,2 $\pm$ 0,3
Vorderstück und Hinterstück	20,5 $\pm$ 0,3

Die Aktivitäten verhalten sich genau additiv. Dieser Befund schließt eine unterschiedliche Inaktivierung des Enzyms in den verschiedenen Zellregionen aus.

3.44 Wir können jetzt mit großer Sicherheit annehmen, daß die Aktivitätsunterschiede auf unterschiedlichen Enzymmengen in den verschiedenen Zellregionen beruhen.

4. DISKUSSION

Es liegen jetzt detaillierte Untersuchungen über das Verhalten aller Enzyme des Glucose- und Galactose-Syntheseweges während der Morphogenese von Acetabularia mediterranea vor. In dieser Arbeit haben wir die Phosphoglucose-isomerase und die Phosphoglucomutase - die ersten Enzyme, die für die Bildung von UDPG und UDPGal aus F-6-P verantwortlich sind - genauer behandelt.

Wir haben eine enge Korrelation zwischen der Hutbildung und der PGM-Aktivität beobachtet. Damit zeigt die PGM analoges Verhalten, wie die in der Synthesekette nachfolgenden Enzyme: die UDPG-Pyrophosphorylase und die UDPG-4-epimerase. Mögliche Artefakte konnten durch Misch- (3.25) und Rückgewinnungsexperimente (3.24) ausgeschlossen werden. Durch die Puromycinversuche wurde gezeigt, daß die während der Morphogenese gemessene Aktivitätszunahme Enzymsynthese repräsentiert. Da die erhöhte Synthese der PGM zum Zeitpunkt der Hutbildung auch in kernlosen Zellen stattfindet, kann eine direkte Regulation dieser Synthese an den Kerngenen (JACOB und MONOD, 1961) ausgeschlossen werden. Die Synthese muß vielmehr im Cytoplasma geregelt werden. Als Alternativen bieten sich an:

a) Die Steuerung der Enzymsynthese erfolgt auf dem Niveau der Proteinsynthese oder
b) die für die PGM verantwortlichen Gene sind in extranucleärer DNA - hier muß vor allem an die DNA der Chloroplasten und Mitochondrien gedacht werden - lokalisiert. Nach einer Arbeitshypothese von GIBOR und GRANICK (1964) könnten diese Organellen ein induzierbares Operon besitzen, und eine Anhebung der Synthese zum Zeitpunkt der Hutbildung könnte über eine Aktivierung dieser Gene erfolgen.

Gegen b) sprechen folgende Fakten: In kernhaltigen Stielhinterstücken, die nur einen geringen Speicher an Kern-DNA-abhängiger m-RNA haben (HÄMMERLING und ZETSCHE, 1966), hemmt Actinomycin die PGM-Synthese sehr stark. Dagegen hat die gleiche Konzentration in kernlosen Pflanzen, die einen Speicher dieser m-RNA's in ihrer Stielspitze enthalten, keinen Einfluß auf die Enzymsynthese. Daß Actinomycin in die Chloroplasten eindringen kann, konnte durch die Hemmung der Chlorophyllsynthese gezeigt werden (ZETSCHE 1968 a, 1969 b); das dürfte auch für mitochondriale DNA gelten, denn Actinomycin hemmt die Transcription der DNA in Mitochondrien (NASS, 1969). Für die Wirkung von Actinomycin auf diese Organellen gibt es auch elektronenmikroskopische Hinweise (WERZ, 1966). Wegen des geringen DNA-Gehaltes des Acetabularia-Chloroplasten (ca. 10^{-16} g DNA pro Chloroplast nach GIBOR und IZAWA, 1963; BALTUS und BRACHET, 1963) im Vergleich zu anderen Organismen (s. GRANICK und GIBOR, 1967), wie auch der Tatsache, daß die bisher untersuchten Enzyme der Chlorophyllsynthese Kern-Gen-abhängig sind (KIRK, 1966), war die Hypothese von vornherein unwahrscheinlich. Außerdem ist gezeigt worden, daß zwei Enzyme, die in den Acetabularia-Chloroplasten lokalisiert sind, durch Kern-DNA codiert werden (SCHWEIGER et al., 1967; REUTER und SCHWEIGER, 1969). Weiter fehlt bis jetzt jeder sichere Hinweis, daß mitochondriale DNA bestimmte Enzyme codiert (NASS, 1969).

Es steht somit fest, daß die PGM-spezifische m-RNA aus dem Kern stammt. Das stimmt mit früheren Befunden überein, die besagen, daß die für die Hutbildung verantwortlichen Gene im Kern lokalisiert sind (HÄMMERLING, 1934, 1963; ZETSCHE 1968 b).

Unsere Ergebnisse haben ein weiteres Beispiel dafür geliefert, daß der Zeitpunkt der RNA-Synthese (Transcription) nicht in direkter zeitlicher Verbindung mit der

Translation in Protein steht. Die aus dem Kern lange vor der Hutbildung in das Cytoplasma geschleuste m-RNA ist über viele Wochen stabil. Für eine stabile m-RNA gibt es inzwischen auch bei anderen Zellen Beispiele, es sei hier nur an die "long lived" m-RNA für die Hämoglobinsynthese in Reticulocyten erinnert (WILT, 1965). Eine Stabilisierung der RNA wäre z.B. durch Kompartimentierung oder Proteinhüllen, die jene vor RNAse - die in Acetabularia nachgewiesen wurde (SCHWEIGER, 1966) - schützen können, denkbar. Weitere Mechanismen über die Stabilität der m-RNA werden zur Zeit diskutiert (z.B. TOMKINS et al., 1969; SUSSMAN, 1970).

Die Regulation der PGM-Synthese erfolgt auf dem Niveau der Translation. Eine verstärkte Synthese der PGM bei der Hutbildung ist durch

a) schnelleres Ablesen des PGM-spezifischen messengers oder
b) die Anlieferung einer größeren aktiv an der Proteinsynthese beteiligten m-RNA-Menge aus den Kompartimenten bzw. den Proteinhüllen zu diesem Zeitpunkt möglich.

Ähnliche Schlußfolgerungen sind auch für andere Zellen (z.B. GROSS et al., 1964; SUSSMAN, 1965; LEVERE und GRANICK, 1965, 1967; HARRIS, 1968; RANBINOVITZ et al., 1969) gezogen worden. Kürzlich konnte die Kontrolle der Translation auch im zellfreien System studiert werden (FRENCH-ANDERSON und GILBERT, 1969).

Ein vollkommen anderes Verhalten zeigt die PGI - das Enzym zu Beginn der Synthesekette: der zeitliche Verlauf der PGI-Aktivität während der Morphogenese wird durch die Hutbildung nicht beeinflußt, die Enzymaktivität steigt - bei kernhaltigen wie kernlosen Zellen - auch danach mit dem Gesamtprotein weiter linear an, d.h. während der ganzen Untersuchungszeit bleibt die spezifische Aktivität konstant. Die aus den Misch-,

Rückgewinnungs-, Puromycin- und Actinomycin-Experimenten gezogenen Schlußfolgerungen - die wir für die PGM bereits diskutiert haben - gelten entsprechend für die PGI. Zusätzlich haben wir für die PGI von Pflanzen unterschiedlicher Entwicklungsstadien K_m-Werte bestimmt, die innerhalb der Fehlergrenzen gleich sind.

Obwohl die PGI sich anders als die nachfolgenden Enzyme verhält, muß man auch für sie Regulationsmechanismen im Cytoplasma fordern, die die Konstanz ihrer Synthese sichern. Wie wird bei kernlosen Pflanzen die konstante Syntheserate der PGI und des Gesamtproteins gesteuert? Wir wollen zwei Möglichkeiten diskutieren:

a) die ganze vorhandene PGI-spezifische m-RNA wird dauernd mit konstanter Rate abgelesen, mit der Zeit gehen statistisch immer mehr Kopien zugrunde, bis endlich überhaupt keine mehr vorhanden sind. Die PGI-Zunahme muß nach dieser Vorstellung immer geringer werden und allmählich auf Null absinken.
b) Die m-RNA kann nicht beliebig oft abgelesen werden, sondern nur eine bestimmte Anzahl von Synthesezyklen durchlaufen (SUSSMAN, 1970). Dann müssen wir einen pool inaktiver RNA postulieren, dem immer eine konstante Menge entnommen wird. Ist der Speicher leer, muß die Synthese sofort aufhören.

Das abrupte Abbrechen der Zunahme der PGI- und der Protein-Nettosynthese in Abb. 21 unterstützt diese zweite Hypothese.

Ein Vergleich der ersten drei Enzyme des Syntheseweges ist möglich, da wir die Enzyme zu je zwein und einmal sogar alle drei zusammen an der gleichen Pflanzenpopulation studiert haben. Auffallend ist die verhältnismässig niedrige spezifische Aktivität der PGI. Obwohl zahlreiche Vorversuche durchgeführt wurden, um optimale Bedingungen für die PGI zu schaffen, ist nicht auszuschlies-

sen, daß die Aktivität in vivo beachtlich höher liegt. Auf Grund der uns jetzt vorliegenden Daten ergibt ein Vergleich der drei Enzyme zum selben Zeitpunkt folgendes Bild: die spezifische Aktivität nimmt von der PGI über die PGM zur UDPG-Pyr hin zu. Die von der PGI katalysierte Reaktion scheint auf den ersten Blick der limitierende Schritt zu sein, der sich für eine Regulation der Enzymaktivität durch allosterische Effektoren anbietet. Nach vorläufigen Versuchen konnten wir tatsächlich eine Aktivierung der PGI mit ADP um 50 % finden. Möglicherweise wird also in vivo die PGI-Aktivität durch geeignete Aktivatoren an die Aktivität der anderen Enzyme angeglichen. Bei der PGM wurde kein derartiger Effekt festgestellt. Eine Veränderung des Verhältnisses von Substrat zu K_m durch erhöhte F-6-P-Konzentrationen, wodurch ein verstärkter Umsatz in vivo erklärt werden könnte, ist als weitere Möglichkeit zu diskutieren (WRIGHT, 1966; MARSHALL et al., 1970).

Das Verhalten der auf die PGI folgenden Enzyme entspricht dem erhöhten Glucose- und Galactosegehalt der Hutpolysaccharide. Das Maximum aller Enzymaktivitäten (einschließlich der PGI) ist in etwa erreicht, wenn die Cystenbildung einsetzt. Dies stimmt gut mit der Tatsache überein, daß die Cystenpolysaccharide - Zellwand und Reserveprodukt Stärke (ZETSCHE, 1970) - hauptsächlich aus Glucose bestehen. Nach neuesten Untersuchungen ZETSCHEs (1970) steigt der Gehalt an glucosehaltigen Polysacchariden bei der Cystenbildung stark an. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß die Enzyme in vivo recht stabil sind (s. 3.34, Abb. 22 und ZETSCHE, 1966 d, 1968 a). Es erscheint also durchaus "sinnvoll", wenn die Pflanze die Enzyme schon lange vor ihrem vermehrten Gebrauch synthetisiert.

Zum Schluß sei noch kurz auf die Verteilung der Enzyme in der Zelle eingegangen:

Die Verteilung der PGM und der UDPG-Pyr kann nach den geschilderten Zeitexperimenten nur darauf beruhen, daß die Enzyme in den vorderen Regionen in größeren Mengen synthetisiert werden als in der hinteren. Eine gleichmäßige Bildung über die ganze Zelle hinweg und ein späterer Transport in die Stielspitze wird danach ausgeschlossen. Die ungleichmäßige PGM-Synthese in den verschiedenen Zellregionen könnte durch einen entsprechenden PGM-spezifischen m-RNA-Gradienten erklärt werden. Auf jeden Fall zeigen die Ergebnisse, daß neben der zeitlichen Korrelation eine enge räumliche Korrelation zwischen Hutbildung und Syntheseort dieser Enzyme in der Zelle besteht (s. auch ZETSCHE, 1969 a).

Die PGI zeigt beim Vergleich mit den anderen Enzymen wieder ein abweichendes Verhalten. Kurz nach dem Zerschneiden weist die PGI in Bezug auf die spezifische Aktivität und Aktivität pro Pflanzenteil den bekannten Gradienten auf. Nach einer 26-tägigen Kulturdauer nimmt jedoch die PGI-Aktivität in allen drei Teilstücken - im Unterschied zu den beiden anderen Enzymen - um denselben absoluten Betrag zu (Abb. 27 und Tab. 3). Wie kann nun der am Tag 0 vorhandene Gradient entstanden sein? Es gibt zwei Möglichkeiten:
a) es findet in den ganzen Zellen ein teilweiser Transport zur vorderen Region statt oder
b) der Gradient bleibt nur in intakten Zellen erhalten. Durch Korrelationserscheinungen (wie sie aus mehrzelligen Geweben bekannt sind) könnte die Synthese im hinteren Teil der Zelle unterdrückt werden.
Vorläufige Experimente sprechen für die erste Möglichkeit; daher ist es nicht ausgeschlossen, daß die PGI-spezifische m-RNA keinen apikal-basalen Konzentrationsgradienten aufweist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Enzyme des Nucleotidzucker-Stoffwechsels bei Acetabularia mediterranea - die Phosphoglucose-isomerase und die Phosphoglucomutase - wurden näher charakterisiert und dafür geeignete Homogenisations- und Reaktionsmedien entwickelt. Kinetische Daten der Enzyme wurden ermittelt; u.a. wurde M-6-P als kompetitiver Inhibitor der PGI erkannt.

Für beide Enzyme wurde gezeigt, daß die während der Morphogenese gemessenen Aktivitätszunahmen tatsächlich Enzymsynthesen repräsentieren.

Zwischen Hutbildung der Pflanzen und PGM-Aktivität wurde eine enge Korrelation beobachtet; die Enzymaktivität nimmt mit Beginn der Hutbildung stark zu.

Die PGI-Aktivität zeigt ein völlig anderes Verhalten; sie weist keine derartige Korrelation auf, sondern steigt linear mit der gleichen Rate wie das Gesamtprotein an.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Steuerung der Synthesen dieser Enzyme im Cytoplasma erfolgt, wahrscheinlich auf der Ebene der Translation.

Weiter wurde gezeigt, daß die beiden Enzyme in einzelnen Zellbereichen unterschiedlich synthetisiert werden.

Das verschiedene Verhalten von PGI und PGM sowie die Beziehung zwischen den Enzymaktivitäten und der Zusammensetzung der Polysaccharide wird diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERS, J. und K. ZETSCHE: unveröffentlicht (1969).

BALTUS, E. und J. BRACHET: Presence of deoxyribonucleic acid in the chloroplasts of Acetabularia mediterranea. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 76, 490-492 (1963).

BETH, K.: Über den Einfluß des Kernes auf die Formbildung von Acetabularia in verschiedenen Entwicklungsstadien. Z. Naturforsch. 8 b, 771-775 (1953).

BETZ, A., K. BRINKMANN und R. HINRICHS: Welchen Informationswert haben in Rohextrakten gemessene Enzymaktivitäten für physiologische Probleme? Planta (Berl.) 80, 77-81 (1968).

BOT, G.: Inhibition of phosphoglucomutase by 6-phosphogluconic acid. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 14, 127-130 (1958).

BRACHET, J., H. DENIS und F. de VITRY: The effects of actinomycin D and puromycin on morphogenesis in amphibian eggs and Acetabularia mediterranea. Developm. Biol. 9, 938-434 (1964).

BRACHET, J.: The role of nucleic acids in morphogenesis. Progr. Biophysics molecular Biol. 15, 97-127 (1965).

BRIGGS, G. E. und J. B. S. HALDANE: A note on the kinetics of enzyme action. Biochem. J. 19, 338-339 (1925).

BÜCHER, T., W. LUH und D. PETTE: Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden. In: HOPPE-SEYLER und THIERFELDER, Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. 6/A, p. 292-339. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.

CLAUSS, H.: Über die Intensität der Proteinsynthese von Acetabularia vor und nach der Hutbildung. Z. Naturforsch. 17 b, 242-244 (1962).

CLAUSS, H., A. LÜTTKE, F. HELLMANN und J. REINERT: Chloroplastenvermehrung in kernlosen Teilstücken von Acetabularia mediterranea und Acetabularia cliftonii und ihre Abhängigkeit von inneren Faktoren. Protoplasma 69, 313-329 (1970).

CLELAND, W. W.: The kinetics of enzyme - catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 67, 104-137 (1963).

CORI, G. T., S. P. COLOWICK und C. F. CORI: The formation of glucose-1-phosphoric acid in extracts of mammalian tissues and of yeast. J. biol. Chem. 123, 375-380 (1938).

— The enzymatic conversion of glucose-1-phosphoric ester to 6-ester in tissue extracts. J. biol. Chem. 124, 543-555 (1938).

DIXON, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170-171 (1953).

DIXON, M. und E. C. WEBB: Enzymes. London: Longmans 1964.

DYSON, J. E. D. und E. A. NOLTMANN: The effect of pH and temperature on the kinetic parameters of phosphoglucose isomerase. J. biol. Chem. 243, 1401 (1968).

FRENCH ANDERSON, W. und J. M. GILBERT: Translational control of in vitro hemoglobin synthesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 585-588 (1969).

GIBOR, A. und M. IZAWA: The DNA content of the chloroplasts of Acetabularia. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 50, 1164-1169 (1963).

GIBOR, A. und S. GRANICK: Plastids and mitochondria: Inheritable systems. Science 145, 890-897 (1964).

GINSBURG, V.: Sugar nucleotides and the synthesis of carbohydrates. Advanc. Enzymol. 26, 35-88 (1964).

GOOD, N. E., G. D. WINGET, W. WINTER, T. N. CONNOLLY, S. IZAWA und R.M.M. SINGH: Hydrogen ion buffers for biological research. Biochem. 5, 467-477 (1966).

GRANICK, S. und A. GIBOR: The DNA of chloroplasts, mitochondria and centrioles. Progr. nucleic acid res. mol. Biol. 6, 143-186 (1967).

GROSS, P. R., L. I. MALKIN und W. A. MOYER: Templates for the first proteins of embryonic development. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 407-414 (1964).

HÄMMERLING, J.: Über formbildende Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organism. 131, 1-18 (1934).

HÄMMERLING, J., H. CLAUSS, K. KECK, G. RICHTER und G. WERZ: Growth and protein synthesis in nucleated and enucleated cells. Exp. Cell. Res., Suppl.: 6, 210-226 (1958).

HÄMMERLING, J.: Nucleo-cytoplasmic interactions in Acetabularia and other cells. Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 65-92 (1963).

HÄMMERLING, J. und K. ZETSCHE: Zeitliche Steuerung der Formbildung von Acetabularia. Cytoplasmatische Regulation versus Genaktivierung. Umschau 66, 489-492 (1966).

HARRIS, H.: Nucleus and cytoplasm. Oxford: Clarendon Press 1968.

HARTMANN, G., W. BEHR, K.-A. BEISSNER, K. HONIKEL und A. SIPPEL: Antibiotica als Hemmstoffe der Nucleinsäure- und Proteinsynthese. Angew. Chemie 80, 710 -718 (1968).

HASSID, W. Z.: Transformation of sugars in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 18, 253-280 (1967).

HELLEBUST, J. A., J. TERBORGH und G. C. McLEOD: The photosynthetic rhythm of Acetabularia crenulata. II. Measurements of photoassimilation of carbon dioxide and the activities of enzymes of the reductive pentose cycle. Biol. Bull. 133, 670-678 (1967).

JACOB, F. und J. MONOD: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. mol. Biol. 3, 318 -356 (1961).

JOSHI, J. G. und P. HANDLER: Phosphoglucomutase. I. Purification and properties of phosphoglucomutase from E.coli. J. biol. Chem. 239, 2741-2751 (1964).

KAHANA, S. E., O. H. LOWRY, D. W. SCHULZ, J. V. PASSONNEAU und E. J. CRAWFORD: The kinetics of phosphoglucoisomerase. J. biol. Chem. 235, 2178-2184 (196o).

KIRK, J. T. O.: Nature and function of chloroplast DNA. In: T. W. GOODWIN, Biochemistry of chloroplasts, vol. 1, p. 319-340. London und New York: Academic Press 1966.

KLENOW, H. und R. EMBERLAND: The enzymatic reaction between ribose-1-phosphate and glucose-1,6-diphosphate. Arch. biochem. biophys. 58, 276-287 (1955).

KLOTZSCH, H. und H.-V. BERGMEYER: Kristallisation von Phosphoglucose-Isomerase aus Hefe. Angew. Chemie 72, 920 (1960).

LEVERE, R. D. und S. GRANICK: Control of hemoglobin synthesis in the cultured chick blastoderm by -aminolevulinic acid synthetase: Increase in the rate of hemoglobin formation with -aminolevulinic acid. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 134-137 (1965).

LEVERE, R. D. und S. GRANICK: Control of hemoglobin synthesis in the cultured chick blastoderm. J. biol. Chem. 242, 1903-1911 (1967).

LINEWEAVER und D. BURK: The determination of enzyme dissocation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934).

LOHMANN, K.: Über Phosphorylierung Dephosphorylierung. Bildung der natürlichen Hexosemonophosphorsäure aus ihren Komponenten. Biochem. Z. 262, 137-160 (1933).

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL: Protein measurement with folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

MAHLER, H. R. und E. H. CORDES: Biological Chemistry. New York: Harper & Row 1966.

MARSHALL, R., D. SARGENT und B. E. WRIGHT: Glykogen turnover in Dictyostelium discoideum. Biochem. 9, 3087-3094 (1970).

NAJJAR, V. A.: The isolation and properties of phosphoglucomutase. J. biol. Chem. 175, 281-290 (1948).

NAJJAR, V. A.: Phosphoglucomutase. In: P. D. BOYER, H. LARDY und K. MYRBÄCK, The enzymes, vol. 6, p. 161-178. London und New York: Academic Press 1962.

NASS, M. M. K.: Mitochondrial DNA: advances, problems and goals. Science 165, 25-35 (1969).

NATHANS, D.: Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of puromycin into peptide chains. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 585-592 (1964).

NOLTMAN, E. und F. H. BRUNS: Reindarstellung und Eigenschaften von Phosphoglucose-isomerase. Biochem. Z. 331, 436-445 (1959).

NORTHCOTE, D. H.: The synthesis and metabolic control of polysaccharides and lignin during the differentiation of plant cells. Essays in Biochem. 5, 89 -137 (1969).

PARR, C. W.: Inhibition of phosphoglucose isomerase. Nature (Lond.) 178, 1401 (1956).

RABINOVITZ, M., M. L. FREEDMAN, J. M. FISHER und C. R. MAXWELL: Translational control in hemoglobin synthesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 567-578 (1969).

RAY, W. J. und G. A. ROSCELLI: A kinetic study of the phosphoglucomutase pathway. J. biol. Chem. 239, 1228-1236 (1964).

REUTER, W. und H.-G. SCHWEIGER: Kernkontrollierte Lactatdehydrogenase in Acetabularia. Protoplasma 68, 357-368 (1969).

RICHTER, G.: Die Tagesperiodik der Photosynthese bei Acetabularia und ihre Abhängigkeit von Kernaktivität, RNS- und Proteinsynthese. Z. Naturforsch. 18 b, 1085-1089 (1963).

SCHWEIGER, E., H. G. WALLRAFF und H.-G. SCHWEIGER: Über tagesperiodische Schwankungen der Sauerstoffbilanz kernhaltiger und kernloser Acetabularia mediterranea. Z. Naturforsch. 19 b, 499-505 (1964).

SCHWEIGER, H.-G.: Ribonuclease-Aktivität in Acetabularia. Planta (Berl.) 68, 247-255 (1966).

SCHWEIGER, H.-G., R. W. P. MASTER und G. WERZ: Nuclear control of a cytoplasmic enzyme in Acetabularia. Nature (Lond.) 216, 554-557 (1967).

SLEIN, M. W.: Phosphomannose isomerase. J. biol. Chem. 186, 753-761 (1950).

— Phosphohexoisomerases from muscle. In: S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, Methods in enzymology, vol. I, p. 299-306. New York: Academic Press 1955.

SUSSMAN, M. und R. R. SUSSMAN: The regulatory program for UDPGalactose polysaccharide transferase activity during slime mold cytodifferentiation: requirement for specific synthesis of ribonucleic acid. Biochim. biophys. Acta 108, 463-473 (1965).

SUSSMAN, M.: Model for quantitative and qualitative control of mRNA translation in eukaryotes. Nature (Lond.) 225, 1245-1246 (1970).

TERBORGH, J. und G. C. McLEOD: The photosynthetic rhythm of Acetabularia crenulata. I. Continuous measurements of oxygen exchange in alternating light-dark regimes and in constant light of different intensities. Biol. Bull. 133, 659-669 (1967).

TOMKINS, G. M., T. D. GELEHRTER, D. GRANNER, D. MARTIN, H. H. SAMUELS und E. B. THOMPSON: Control of specific gene expression in higher organisms. Science 166, 1474-1480 (1969).

TRIPLETT, E. L., A. STEENS-LIEVENS und E. BALTUS: Rates of synthesis of acid phosphatases in nucleate and enucleate Acetabularia fragments. Expl. Cell Res. 38, 366-378 (1965).

VANDEN DRIESSCHE, T. und S. BONOTTO: The circadian rhythm in RNA synthesis in Acetabularia mediterranea. Biochim. biophys. Acta 179, 58-66 (1969).

VEITCH, F. P.: Competitive shunt mechanism. Biochim. biophys. Acta 86, 21-25 (1964).

WERZ, G.: Morphologische Veränderungen in Chloroplasten und Mitochondrien von verdunkelten Acetabularia-Zellen. Planta (Berl.) 68, 256-268 (1966).

WILT, F. H.: The concept of messenger RNA and cyto-differentiation. Amer. Zool. 6, 67-74 (1966).

WRIGHT, B. E.: Multiple causes and controls in differentiation. Science 153, 830-837 (1966).

ZETSCHE, K.: Hemmung der Synthese morphogenetischer Substanzen im Zellkern von Acetabularia mediterranea durch Actinomycin D. Z. Naturforsch. 19 b, 751-759 (1964).

— Anreicherung von morphogenetischen Substanzen in Lichtpflanzen von Acetabularia mediterranea unter dem Einfluß von Puromycin. Planta (Berl.) 64, 119-128 (1965).

— Entkopplung morphogenetischer Prozesse in Acetabularia mediterranea durch p-Fluorphenylalanin. Planta (Berl.) 68, 360-370 (1966 a).

ZETSCHE, K.: Anreicherung von Proteinsynthese induzierenden Substanzen in Acetabularia mediterranea unter dem Einfluß von Puromycin. Z. Naturforsch. 21 b, 88-90 (1966 b).

— Regulation der zeitlichen Aufeinanderfolge von Differenzierungsvorgängen bei Acetabularia. Z. Naturforsch. 21 b, 375-379 (1966 c).

— Regulation der UDPG-4-Epimerasesynthese in kernhaltigen und kernlosen Acetabularien. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 124, 332-338 (1966 d).

— Nachweis von Enzymen des Galactosestoffwechsels in der Grünalge Acetabularia mediterranea. Planta (Berl.) 68, 240-246 (1966 e).

— Unterschiedliche Zusammensetzung von Stiel- und Hutzellwand bei Acetabularia mediterranea. Planta (Berl.) 76, 326-334 (1967).

— Regulation der UDPG-Pyrophosphorylaseaktivität in Acetabularia. I. Morphogenese und UDPG-Pyrophosphorylasesynthese in kernhaltigen und kernlosen Zellen. Z. Naturforsch. 23 b, 369-376 (1968 a).

— Steuerung der Zelldifferenzierung bei der Grünalge Acetabularia. Biol. Rdsch. 6, 97-112 (1968 b).

— Regulation der UDPG-Pyrophosphorylaseaktivität in Acetabularia. II. Unterschiedliche Synthese des Enzyms in verschiedenen Zellregionen. Planta (Berl.) 89, 244-253 (1969 a).

— Die Wirkung von RNA- und Proteinsyntheseinhibitoren auf den Chlorophyllgehalt kernhaltiger und kernloser Acetabularien. Planta (Berl.) 89, 284-298 (1969 b).

— unveröffentlicht (1970).

ZETSCHE, K., G. GRIENINGER und J. ANDERS: Regulation of enzyme activity during morphogenesis of nucleate and anucleate cells of Acetabularia. In: J. BRACHET und S. BONOTTO, Biology of Acetabularia, p. 87-110. New York und London: Academic Press 1970.

LEBENSLAUF

Am 30. Oktober 1941 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Friedrich Johannes Christian Grieninger und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Schmid in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1948 bis 1952 trat ich in das Gottlieb-Daimler-Gymnasium in Stuttgart-Bad Cannstatt ein, wo ich im Frühjahr 1961 mit dem Abitur abschloß. Danach absolvierte ich bei der Daimler-Benz AG in Stuttgart-Untertürkheim ein halbjähriges Betriebspraktikum. Im WS 1961/62 hörte ich ein Semester Maschinenbau an der Technischen Hochschule Stuttgart. Nach einem Wechsel des Studienfaches besuchte ich vom SS 62 bis zum WS 63/64 die Universität Tübingen mit den neuen Fächern Biologie und Chemie. Diese Fächer wurden in den folgenden Jahren beibehalten: vom SS 64 bis WS 64/65 an der Universität Wien und seit SS 65 wieder an der Universität Tübingen. 1968 faßte ich unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Bünning eine Zulassungsarbeit "Zur Struktur und Reaktivität von Adenosintriphosphat" ab und schloß mein Studium mit dem Staatsexamen in Biologie und Chemie ab. Im gleichen Jahr begann ich unter der Anleitung von Doz. Dr. Zetsche am Institut für Biologie der Universität Tübingen die Dissertation "Regulation der Aktivität von Phosphoglucose-isomerase und Phosphoglucomutase während der Morphogenese kernhaltiger und kernloser Acetabularien".

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

E. Bayer, Broda, Brukl, Bünning, Gierer, Gieseler, Grell, Hanack, Hoffmann-Ostenhof, Kortüm, Lingens, Mägdefrau, Metzner, Möhres, E. Müller, Rüdorff, Seyffert, B. Schwemmle, Tuppy, Wieser, Wittmann, Zetsche, Zimmermann